

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas



TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Actividad antitrombótica de proteínas de amaranto.

Lic. Ana Clara Sabbione

Dirección: Dra. Adriana Scilingo

2015

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

TESIS DOCTORAL
2015

ACTIVIDAD ANTITROMBÓTICA DE PROTEÍNAS DE AMARANTO

Lic. Ana Clara Sabbione



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

*El presente trabajo, para optar por el grado académico de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el
Centro de de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de
Alimentos (CIDCA- CONICET- UNLP, La Plata, Argentina)
bajo la dirección de la Dra. Adriana Scilingo.*

"Las utopías de hoy son realidades del mañana, nunca dejes de soñar..."

Yanina Soledad Sabbione

A decorative graphic featuring three green circles of varying sizes. Each circle is surrounded by a light gray shadow, giving it a 3D effect. Two thin green lines intersect diagonally across the page, one from the top-left to the bottom-right, and another from the top-right to the bottom-left, forming an 'X' shape.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A **Adriana**, por haberte comprometido en un 100% desde el inicio de esta tesis, habiéndome brindado absolutamente todo lo necesario para que pueda culminar esta etapa de mi vida de la manera más grata. La relación que supimos forjar en estos cinco años trascendió la barrera becaria-directora para convertirse en algo especial. Sentí un apoyo incondicional de tu parte, no sólo por haber compartido tu experiencia y tus conocimientos conmigo, sino también porque supiste encontrar siempre la palabra justa en el momento adecuado. Gracias, una y mil veces...

A **Cristina**, por enseñarme que con dedicación, trabajo y honestidad se pueden lograr las cosas. Gracias por el apoyo y la confianza.

A **Ceci, Juli, Kity, Charlie y Nachito**, por la amistad que supimos cultivar y disfrutar a lo largo de estos años, y por las horas de catarsis compartidas.

A mis compañeros de laboratorio, **Pau, Ale, Fran, Agus, Yani, Santi, Susan, Lu, Ceci C., Pablo, Nora, Vale, Adri** por su constante compañerismo y ayuda. Es realmente gratificante compartir los días con ustedes.

A **Gustavo**, por haberme ayudado durante la realización de los ensayos con animales. Desinteresadamente y con una inimaginable dedicación estuviste a mi lado durante muchos meses de trabajo. Encontré en vos no sólo un compañero de experiencias, sino también a un amigo.

A **Mariana**, por haberme ayudado durante la realización de las pruebas globales de la hemostasia. Tu gran predisposición y tu excelente compañía hicieron que todo resultase más fácil.

A **Mamá** y a **Papá**, por respetar y apoyar totalmente a todas y cada una de mis decisiones. Por priorizar mi felicidad ante todo. Por estar SIEMPRE.

A **Yani** y **Adri**, por cuidarme, malcriarme y amarme como si fuera una hija más.

AGRADECIMIENTOS

A *Nati*, por ser mí felicidad absoluta. Gracias por haberme apoyado en esta etapa tan difícil, demostraste tener una paciencia sin límites en estos últimos meses.

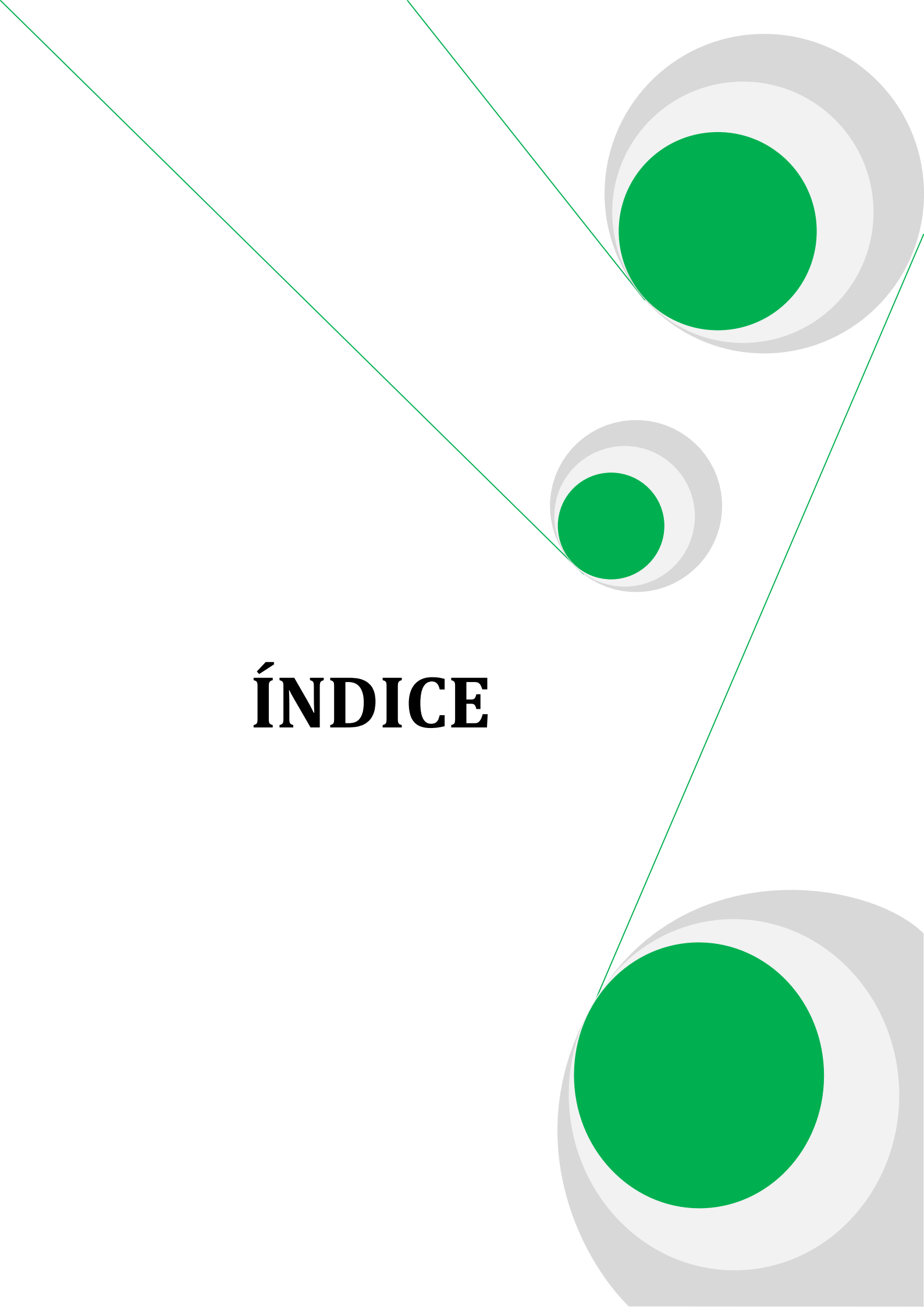
A *mis sobrinos*, por tener la increíble capacidad de sacar mis más grandes sonrisas.

A *Ro* y *Sole*, por ser esas amigas de fierro de las que ya no quedan.

A *CONICET*, por la beca otorgada, la cual contribuyó a mí formación en la investigación científica.

A la *Universidad Nacional de La Plata*, pública y gratuita, por la formación básica recibida.

ÍNDICE



ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Alimentos funcionales	1
1.2 Enfermedades cardiovasculares	3
1.2.1 Trombosis	5
1.2.2 Hemostasia	6
1.3 Amaranto	21
1.3.1 Características del amaranto	21
1.3.2 Algunas propiedades valiosas	22
1.3.3 El amaranto en el Código Alimentario Argentino (CAA)	23
1.3.4 Proteínas de reserva de las semillas de amaranto	24
1.4 Péptidos bioactivos	27
1.4.1 Obtención de péptidos bioactivos	29
1.4.2 Biodisponibilidad de péptidos bioactivos	31
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivos generales	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Materiales y muestras de amaranto	35
3.1.1 Semillas de amaranto	35
3.1.2 Obtención de la harina de amaranto	35
3.1.3 Preparación de los aislados proteicos	35
3.1.4 Obtención de las fracciones proteicas	36
3.1.5 Preparación de los hidrolizados proteicos de amaranto	38
3.2 Caracterización de las muestras	41
3.2.1 Composición centesimal de las muestras	41
3.2.2 Determinación del grado de hidrólisis (GH%)	43
3.2.3 Electroforesis	45
3.2.4 Análisis por cromatografía	49
3.2.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	52
3.2.6 Determinación de secuencias peptídicas	53
3.3 Determinación de las propiedades anticoagulantes de las proteínas de amaranto	53
3.3.1 Determinación de la actividad antitrombótica <i>in vitro</i>	53
3.3.2 Determinación de la actividad antitrombótica <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	62
3.3.3 Ensayos <i>in vitro</i> en cultivos celulares	72
3.4 Análisis estadístico de los resultados	76
4 RESULTADOS I Protocolos de hidrólisis	
4.1 Preparación de hidrolizados de amaranto por acción de una proteasa endógena	78
4.1.1 Estudios asociados a la actividad de la proteasa endógena	79
4.1.2 Caracterización	89
4.1.3 Estudio de la actividad antitrombótica <i>in vitro</i>	94
4.2 Preparación de hidrolizados de amaranto por hidrólisis con alcalasa y tripsina	96

ÍNDICE

4.2.1 Caracterización	97
4.2.2 Estudio de la actividad antitrombótica <i>in vitro</i>	103
4.3 Preparación de hidrolizados de amaranto por digestión gastrointestinal simulada	104
4.3.1 Caracterización	104
4.3.2 Estudio de la actividad antitrombótica <i>in vitro</i>	109
4.4 Conclusiones del capítulo	112
5 RESULTADOS II Hidrolizados obtenidos por digestión gastrointestinal simulada	
5.1 Muestras utilizadas	113
5.2 Estudio de la actividad antitrombótica	113
5.2.1 Actividad antitrombótica <i>in vitro</i>	113
5.2.2 Actividad antitrombótica <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	113
5.2.3 Fraccionamiento del aislado sometido a digestión gastrointestinal simulada	132
5.2.4 Determinación de las secuencias aminoácidas de péptidos antitrombóticos	140
5.3 Conclusiones del capítulo	150
6 RESULTADOS III Fracciones proteicas de amaranto	
6.1. Caracterización de las fracciones proteicas	152
6.1.1 Rendimiento	152
6.1.2 Composición	152
6.1.3 Grado de hidrólisis	153
6.1.4 Electroforesis	155
6.1.5 Análisis térmico (DSC)	156
6.1.6 Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)	158
6.2 Determinación de la actividad antitrombótica	165
6.2.1 Método de las microplacas (MM)	165
6.2.2 Pruebas globales de la hemostasia	167
6.3 Conclusiones del capítulo	171
CONCLUSIONES GENERALES	172
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175

An abstract graphic design featuring three green circles of varying sizes. Each circle is surrounded by a light gray ring and a darker gray shadow, giving them a 3D appearance. Two thin green lines intersect diagonally across the page, one from the top-left and another from the top-right, meeting near the center. The word "INTRODUCCIÓN" is centered in a bold, black, serif font.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Alimentos funcionales

Muchas de las enfermedades prevalentes en el mundo hoy en día presentan una importante relación con la alimentación. La dieta puede ejercer una contribución directa a la causa de las enfermedades, aumentar el riesgo a padecerlas, producir un efecto benéfico que permita cierta disminución de su padecimiento o hasta prevenirlas completamente. Una alimentación saludable combinada con la ingesta de alimentos funcionales puede ayudar a minimizar o prevenir ciertas enfermedades (Vidal-Carou, 2008).

El concepto de alimento funcional nació en Japón en la década de 1980 cuando las autoridades japonesas tomaron conciencia de que para controlar los gastos globales en salud era necesario desarrollar alimentos que mejoraran la calidad de vida de la población (Arai, 1996). En el año 1991 crearon el término FOSHU, sigla que significa *Foods for specified health uses*.

Se entiende que *un alimento es funcional si contiene algún componente, nutriente o no, que beneficia un número limitado de funcionalidades en el cuerpo proporcionando bienestar y salud, entendido como reducción del riesgo a contraer enfermedades* (Amer. Diet Assoc., 1999).

Existen alimentos funcionales naturales y otros que pueden convertirse en funcionales durante su procesamiento (Roberfroid, 2000) realizando algunas operaciones. Un posible camino sería incrementar la concentración de un componente natural del alimento para alcanzar una concentración que se espera que induzca los efectos deseados. Por ejemplo, la fortificación con micronutrientes para lograr una ingesta mayor que las recomendaciones dietéticas. Otra opción implica adicionar un componente que no esté normalmente presente en los alimentos de consumo habitual y para el cual se hayan demostrado efectos beneficiosos. También podría reemplazarse un componente del alimento, generalmente un macronutriente cuya ingesta sea excesiva y que muestre efectos deletéreos, por otro componente beneficioso para la salud. Por ejemplo la sustitución de grasa por fibra dietética. Por último, se podría incrementar la

biodisponibilidad o la estabilidad del componente funcional conocido con el objeto de asegurar un efecto funcional o reducir el riesgo de aparición de enfermedades.

En el mundo ha aumentado considerablemente el interés de los consumidores por conocer la relación existente entre la dieta y la salud. Actualmente está ampliamente reconocido que llevar un estilo de vida sano, incluyendo una dieta saludable, puede contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades y dolencias, y a mantener el estado de salud y bienestar.

La necesidad de contar con alimentos que sean más beneficiosos para la salud, también se enmarca en los cambios socioeconómicos y demográficos que se están dando en las diferentes poblaciones. El aumento de la esperanza de vida, que tiene como consecuencia el incremento del número de personas de la población anciana, el estilo de vida moderno, caracterizado por baja o nula actividad física y elevados niveles de estrés, y el deseo de gozar de una mejor calidad de vida, han potenciado el interés de gobiernos, investigadores, profesionales de la salud y de la industria alimentaria hacia la búsqueda del control de estos cambios. Los alimentos funcionales parecen ser un posible camino hacia el control ya que han ofrecido una aproximación novedosa para lograr una salud óptima, promoviendo a su vez el uso de productos naturales que otorgan beneficios fisiológicos al consumidor y reducen el riesgo de contraer enfermedades crónicas (Shaidi, 2004). Claramente han surgido como una alternativa o como un complemento a la medicación convencional, tanto en la prevención y manejo de enfermedades como en el mantenimiento de la salud (Kris-Etherton y col., 2002; Udenigwe y Aluko, 2012).

Los alimentos funcionales pueden contener componentes de diferente naturaleza con probada actividad fisiológica, denominados compuestos bioactivos. Dentro de este conjunto de sustancias se encuentran las proteínas alimentarias y los péptidos encriptados en su secuencia. En los últimos años se ha evidenciado una tendencia creciente e interés en la utilización de péptidos derivados de proteínas alimentarias debido a su variedad y remarcable multifuncionalidad (Martínez-Maqueda y col., 2012; Udenigwe y Aluko, 2012).

1.2 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, World Health Organization, 2011a), el término enfermedades cardiovasculares, ECV, hace referencia a todo tipo de enfermedades relacionadas con el corazón o los vasos sanguíneos. Este término describe cualquier enfermedad que afecte al sistema cardiovascular. Las patologías incluidas son muy diversas. Entre ellas podemos mencionar las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebrovasculares y las arteriopatías periféricas, que son enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco, el cerebro y los miembros superiores e inferiores, respectivamente; las cardiopatías reumáticas, lesiones del miocardio y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, las cardiopatías congénitas que incluyen las malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento, y por último, la trombosis. Esta última patología involucra la formación de coágulos de sangre, denominados trombos, en circunstancias particulares, que pueden desprenderse y alojarse en los vasos sanguíneos generando obstrucciones que impiden que la sangre fluya normalmente. Se deduce entonces que los bloqueos circulatorios producidos tendrán resultados diversos de acuerdo a cuáles sean los órganos afectados, resultando frecuentemente fatales los que involucren al sistema nervioso central o al corazón.

Como hemos mencionado, según la OMS (World Health Organization, 2011a), cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Se calcula que en 2008 murieron 17,3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo; 7,3 millones de esas muertes se debieron a la cardiopatía coronaria, y 6,2 millones a los accidentes cerebro vasculares, ACV (World Health Organization, 2011b). Un porcentaje importante de las muertes anuales se pueden atribuir a la hipertensión (Lim y col., 2012), factor de alta incidencia en las muertes por ACV y cardiopatía coronaria (World Health Organization, 2008).

El futuro cercano está en sintonía con los datos presentados: las previsiones muestran que en 2030 morirán cerca de 23,3 millones de personas por ECV, sobre todo por

cardiopatías y ACV, permaneciendo como la principal causa de muerte (Mathers y Loncar, 2006).

Más de 80% de las defunciones causadas por las ECV en el mundo se producen en los países de ingresos bajos y medianos (Gersh y col., 2010). En América Latina se estima que entre 1990 y 2020, las muertes causadas por ECV aumentarán en un 145% aproximadamente en ambos sexos, mientras que en el mismo período, en los países desarrollados el aumento será del 28% en mujeres y del 50% en hombres (Yusuf y col., 2004).

A nivel macroeconómico, las ECV representan una pesada carga para las economías de los países de ingresos bajos y medios, en los cuales la muerte prematura de muchas personas por enfermedades no transmisibles, en particular las ECV y la diabetes, pueden reducir hasta el 7% el producto bruto interno. En particular en Argentina se pierden más de 600000 años de vida saludables (AVISA*) a causa de las enfermedades coronarias y accidentes cerebrovasculares al año. Esto representa un costo anual adicional para el país de casi 520 millones de dólares (Rubistein y col., 2010). Además se estima que unas 60 mil personas por año sufren trombosis, produciendo más fallecimientos que la sumatoria de muertes por SIDA, los siniestros viales y el cáncer de mama.

La prevención y el control de las ECV debe abordarse mediante una acción global e integrada que requiere la combinación de medidas que tiendan a reducir los riesgos en la totalidad de la población y el establecimiento de estrategias dirigidas hacia los individuos con alto riesgo o que ya padecen la enfermedad. Aun cuando las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte y discapacidad en Argentina, los programas nacionales, provinciales y municipales continúan centrando sus intervenciones casi exclusivamente en el control de las enfermedades transmisibles o perinatales (Rubistein y col., 2011). Es imperativo emprender acciones y establecer programas dirigidos a cambiar los hábitos y estilos de vida de la población, e implementar simultáneamente intervenciones clínicas que lleven a reducir la incidencia

** AVISA: miden el impacto en la población de diferentes enfermedades en una sociedad determinada y permiten señalar los años de vida que se pierden debido a muertes prematuras o que se viven con una discapacidad.*

de las enfermedades cardiovasculares en nuestro país.

1.2.1 Trombosis

La trombosis es considerada una patología multicausal (Lensing y col., 1999), resultante del efecto de factores genéticos y adquiridos que interactúan entre sí. Se define como un proceso patológico en el que los mecanismos de la hemostasia se ponen en marcha ante estímulos no fisiológicos, es decir, con una finalidad no reparadora, obteniendo como resultado la obstrucción coagulativa de un vaso sanguíneo. La trombosis puede darse en cualquier parte del aparato circulatorio: corazón, arterias, venas y capilares. En condiciones normales, los mecanismos de regulación de la hemostasia permiten la formación temporal de trombos; sin embargo, cuando los procesos patológicos vencen a los mecanismos regulatorios se da inicio a la trombosis, formación de trombos, o a una hemorragia o sangrado excesivo (Handin, 2005).

Las trombosis pueden clasificarse según el nivel de oclusión que alcanzan y el lugar en el que se originan. Según el grado de oclusión, podemos diferenciar entre trombos ocluyentes y murales. Los primeros son aquellos en los que el vaso queda completamente obstruido por la afección, mientras que en los murales, el resultado es una obstrucción parcial. En relación a la ubicación, las trombosis se clasifican según tres tipos: por precipitación, hialina o por coagulación.

Las trombosis por precipitación se producen principalmente en arterias o en el corazón, y se deben al desprendimiento de plaquetas. Son de carácter mural y el trombo implicado en la misma (trombo blanco) se compone de glóbulos blancos, plaquetas y fibrina. La trombosis hialina se produce en vénulas o capilares. Los trombos que participan en la misma suelen ser obturantes y se componen de plaquetas y fibrina. La trombosis por coagulación se produce en las venas y los trombos implicados en la misma se componen de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y fibrina (trombos rojos). Suelen ser de naturaleza oclusiva provocando que el territorio más allá del trombo deje de recibir irrigación sanguínea, produciéndose inicialmente isquemia y luego la necrosis de las estructuras (Handin, 2005). Dependiendo de la ubicación de la vena estas

trombosis pueden ser graves (trombosis del seno cavernoso), de mediana gravedad (trombosis venosa profunda) o leves (tromboflebitis superficial).

1.2.2 Hemostasia

La hemostasia es el proceso que mantiene la integridad del sistema circulatorio, cerrado y de alta presión, luego de generado un daño vascular. Las lesiones en las paredes de los vasos junto con la extravasación de la sangre inician rápidamente eventos en la pared del vaso y en la sangre que sellan la brecha. En este proceso intervienen tres factores, el endotelio vascular, las plaquetas circulantes y las proteínas plasmáticas o factores de coagulación. En condiciones normales la actividad de estos tres factores se regula cuidadosamente, manteniéndose un delicado equilibrio entre potenciales coagulantes y anticoagulantes, que asegure la fluidez de la sangre. En respuesta a una agresión, los tres factores actuarán de manera conjunta para detener la hemorragia y reparar la lesión.

El proceso hemostático se puede dividir en cuatro fases:

1. **Vasoconstricción** local en las proximidades de la zona donde se produjo la injuria. En el momento de producirse la lesión en el vaso, la pared del mismo responde con vasoconstricción de corta duración, unos 30 segundos, resultado de la estimulación de las terminaciones simpáticas que inervan la pared vascular. Esta vasoconstricción es seguida por una vasoconstricción secundaria, más duradera, debida a la liberación de sustancias contenidas en las plaquetas tales como la serotonina y el tromboxano A₂.
2. **Hemostasia primaria:** Es el proceso de formación del tapón plaquetario, que se inicia segundos después del traumatismo vascular. Esta fase implica la *adhesión plaquetaria*, la *activación* de las plaquetas y *secreción* de sustancias contenidas en ellas y la *agregación plaquetaria*.

La pared del vaso desempeña un papel fundamental en esta etapa (**Figura I.1**). La capa interior, llamada endotelio, contiene tres sustancias reguladoras del trombo: el óxido nítrico (Ignaro y col., 1987; Palmer y col., 1987), la prostaciclina (Marcus y col., 2002) y la ectonucleotidasa CD39 (Marcus y col., 2005). Estas sustancias proveen una

defensa contra la formación de trombos. También intervienen el colágeno, presente en la matriz subendotelial, y el factor tisular. Cuando se genera una lesión en la pared del vaso que ocasiona la ruptura del endotelio, el colágeno y el factor tisular entran en contacto con la sangre, iniciándose la formación del trombo (**Figura I.1**) por dos vías independientes denominadas intrínseca (vía del colágeno) y extrínseca (vía del factor tisular) que actúan en paralelo y conducen a la activación plaquetaria (Dubois y col., 2006; Mangin y col., 2006). El colágeno expuesto desencadena la acumulación y activación de plaquetas, mientras que el factor tisular inicia la generación de trombina (hemostasia secundaria), la cual no sólo convierte al fibrinógeno en fibrina, sino que también interviene en la activación plaquetaria. Dependiendo de la lesión o la patología, una vía puede predominar por sobre la otra, pero las consecuencias desencadenadas por cada una de ellas es la misma.

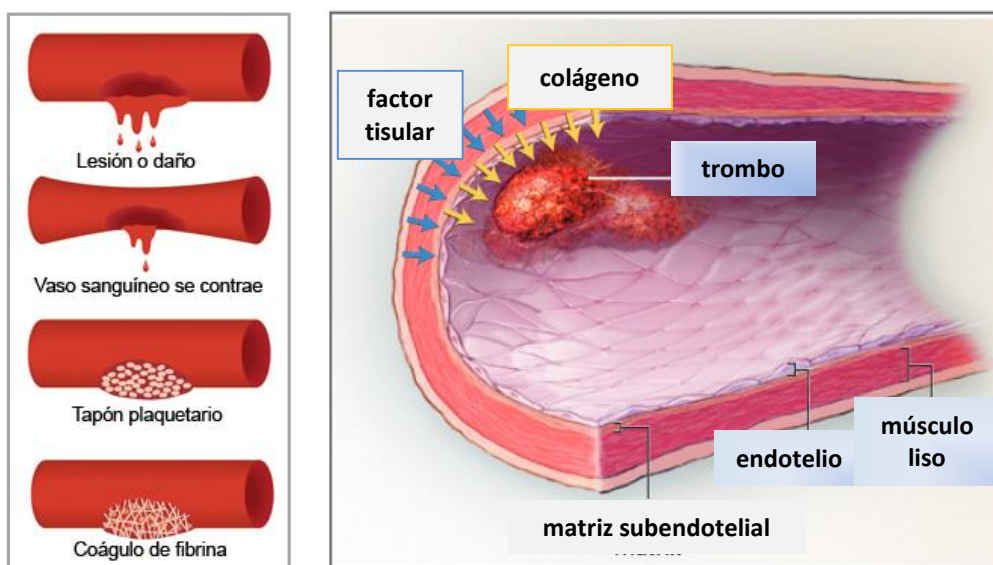


Figura I.1 Esquema de la respuesta de la pared del vaso frente a una lesión vascular.

Las plaquetas presentes en la sangre se concentran en la zona de la lesión formando una monocapa y se convierten en el principal componente del trombo en desarrollo. Este proceso se denomina **adhesión plaquetaria** y se produce por la exposición de las plaquetas al colágeno. Las plaquetas, inicialmente de forma discoide se vuelven esféricas y emiten pseudópodos para aumentar y mejorar la superficie de adhesión a la lesión.

Para que se produzca la adhesión de las plaquetas al subendotelio, se requiere la intervención de un complejo glicoproteico presente en la membrana plaquetaria y del factor de von Willebrand, que se encuentra presente tanto en el plasma como en el subendotelio. Las plaquetas no se adhieren a las células vasculares endoteliales normales, pero sí lo hacen a varios componentes del tejido conectivo subendotelial cuando el endotelio se encuentra lesionado. El factor de von Willebrand es una glicoproteína que permite a las plaquetas permanecer unidas a la pared del vaso a pesar de las elevadas fuerzas tangenciales que se generan en el interior de la luz vascular. Forma un enlace entre un receptor de la superficie de las plaquetas y las fibrillas de colágeno subendoteliales y se une a otro receptor plaquetario, GP IIb/IIIa, que es fundamental para la agregación plaquetaria (Massberg y col., 2003; Bergmeier y col., 2006).

En el momento en que se produce el contacto de las plaquetas con el subendotelio se disparan varios cambios químicos. Comienza la liberación de ADP de los gránulos citoplasmáticos, la síntesis de tromboxano A₂, la reacción *flip-flop* de los fosfolípidos presentes en la membrana de las plaquetas, la liberación de señales químicas por parte de las plaquetas para reclutar más plaquetas y la síntesis de la trombina, todos mecanismos puestos en juego para dar inicio a la **agregación plaquetaria** (López-Farré y Macaya, 2013). El proceso comienza al activarse la membrana plaquetaria y penetrar calcio al citoplasma, lo que ocasiona la contracción de la plaqueta, y con ello la liberación de componentes plaquetarios almacenados en sus gránulos, de vital importancia para la formación del coágulo. En la reacción *flip-flop* las plaquetas pueden reordenar su membrana de manera de translocar sus fosfolípidos como la fosfatidilserina, localizada en el interior de la célula, para que aparezca hacia el exterior, la cual sirve de anclaje, mediante los iones Ca²⁺ para los complejos procoagulantes (Hemker y col., 1983) que se forman durante la cascada de la coagulación (Hemostasia secundaria).

La vía del *factor tisular* (FT) es también denominada vía extrínseca de la coagulación. El FT da inicio a la cascada proteolítica que conduce a la formación de trombina (hemostasia secundaria), la cual se une al receptor presente en la superficie de

las plaquetas provocando su activación (Burgess y col., 2000) y, con ello, la liberación por parte de las mismas de ADP, calcio y tromboxano A₂, tal como se mencionó anteriormente. Los agonistas liberados activan a otras plaquetas de modo de amplificar las señales para la formación del trombo.

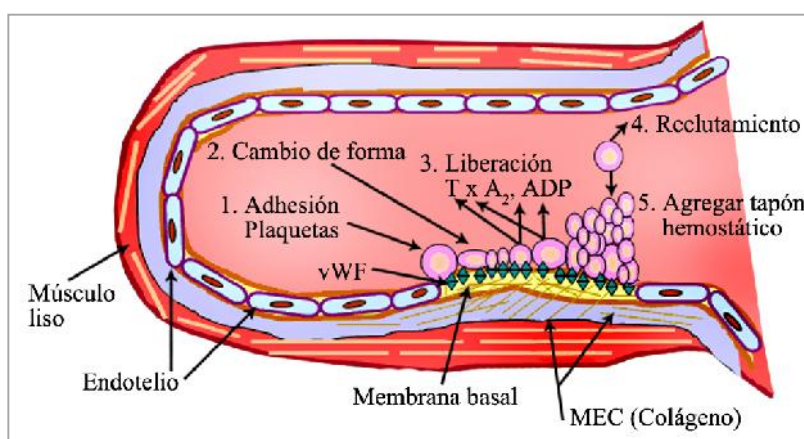


Figura I.2 Esquema de la adhesión y activación plaquetaria. Hemostasia primaria.

Una vez adheridas y activadas las plaquetas se produce la **agregación plaquetaria**. En este fenómeno interviene el fibrinógeno plasmático, que como puede unirse a dos receptores glicoproteicos situados en dos plaquetas diferentes en presencia de Ca²⁺, puede dar origen a puentes interplaquetarios y, por consiguiente, a la formación de una red de fibrinógeno y plaquetas que constituye el coágulo primario (Smith y col., 1990). Este coágulo primario, si bien evita la hemorragia generada a causa de una lesión, es soluble y reversible, por lo que requiere la presencia de una malla de fibrina para estabilizarse y perdurar en el tiempo (hemostasia secundaria). En la **Figura I.2** se grafican algunos de los mecanismos puestos en juego durante la etapa de la hemostasia primaria.

3. Hemostasia secundaria: recibe comúnmente el nombre de coagulación. En la superficie de las plaquetas activadas una gran cantidad de factores de la coagulación trabajan de manera conjunta y participan en una serie de reacciones enzimáticas encadenadas que a su vez se amplifican, conformando la denominada **cascada de la coagulación**. Los *factores* de la coagulación circulan en la sangre sin estar activados, pero

cuando ocurre la injuria del vaso se inicia la cascada de la coagulación y cada uno de ellos se activa en un orden específico para dar lugar a la formación final del coágulo. Los factores que intervienen en la coagulación se designan con un número romano elegido de acuerdo al orden en que fueron descubiertos, acompañado por una letra *a* en caso de que se encuentren activos. La función de cada uno de ellos se encuentra detallada en la **Tabla I.1**.

El coágulo finalmente obtenido o coágulo secundario, es una red tridimensional de fibrina que eventualmente contiene plaquetas, otras proteínas, agua, sales y hasta células sanguíneas atrapadas entre sus fibras. Para que el coágulo exista, es preciso que durante la cascada de la coagulación el fibrinógeno (Factor I), proteína soluble presente en sangre, experimente un cambio químico que lo convierta en fibrina, proteína insoluble y capaz de entrelazarse con otras moléculas iguales, para formar enormes agregados macromoleculares en forma de una red tridimensional (Beutler, 1990).

En la cascada de la coagulación intervienen más de 12 proteínas, iones de Ca^{2+} y algunos fosfolípidos de membranas celulares (**Tabla I.1**). Siete de los factores de la coagulación (V, II, VII, IX, X, XI y XII) son proenzimas sintetizadas en el hígado, las cuales no tienen una actividad catalítica importante, pero pueden convertirse en enzimas activas cuando se hidrolizan determinadas uniones peptídicas. Dichas enzimas son capaces de activar al siguiente factor de la cascada.

La cascada de la coagulación se divide clásicamente para su estudio en tres vías: la *vía intrínseca*, la *vía extrínseca* y la *vía común*. Las vías intrínseca y extrínseca son las vías de iniciación de la cascada, mientras que la vía común es hacia donde confluyen las otras dos desembocando en la conversión de fibrinógeno en fibrina. Esta división es un tanto arbitraria y tiene más que ver con las deficiencias de las técnicas que en su momento se utilizaron para esclarecer los mecanismos implicados, que con lo que ocurre realmente en una lesión vascular, ya que en ese caso se sabe que se establecen varias interrelaciones entre las vías de iniciación.

Tabla I.1 Factores de la coagulación sanguínea y su función

<i>Factor</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Función</i>
I	Fibrinógeno	Se convierte en fibrina por acción de la trombina. La fibrina constituye la red que forma el coágulo.
II	Protrombina	Se convierte en trombina por acción del factor X _a . La trombina cataliza la formación de fibrina a partir de fibrinógeno.
III	Factor tisular	Se libera cuando existe daño celular; participa junto con el factor VII _a en la activación del factor X por la vía extrínseca.
IV	Ion calcio, Ca ²⁺	Interviene en la unión de los factores IX, X, VII y II a fosfolípidos de membrana.
V	Proacelerina	Potencia la acción de X _a sobre la protrombina.
VI	Variante activada de V	-----
VII	Proconvertina	Participa en la vía extrínseca, forma un complejo con los factores III y Ca ²⁺ que activa al factor X.
VIII:C	Factor antihemofílico	Indispensable para la acción del factor X (junto con el IX _a).
VIII R:Ag	Factor von Willebrand	Media la unión del factor VIII:C a plaquetas.
IX	Factor Christmas	Convertido en IX _a por el XI _a . El complejo IX _a -VIII-Ca ²⁺ activa al factor X.
X	Factor Stuart-Prower	Activado por el complejo IX _a -VIII-Ca ²⁺ en la vía intrínseca o por VII-III-Ca ²⁺ en la extrínseca, es responsable de la hidrólisis de protrombina para formar trombina
XI	Tromboplastina plasmática	Convertido en la proteasa XI _a por acción del factor XII _a ; XI _a activa al factor IX.
XII	Factor Hageman	Se activa en contacto con superficies extrañas por medio de calicreína asociada a quinínogeno; convierte al factor XI en XI _a
XIII	Factor Laili-Lorand	Activado a XIII _a ; forma enlaces cruzados entre restos de lisina y glutamina contiguos de los filamentos de fibrina, estabilizándolos.
Precalicreína	Factor Fletcher	Activada a calicreína, juntamente con el quinínogeno; convierte al factor XII en XII _a .
Quinínogeno	Factor Fitzgerald-Flaujeac-Williams	Coayuda con la calicreína en la activación del factor XII.

El mecanismo básico de cada reacción de las vías implica el ensamblado de un complejo compuesto por una enzima (factor de coagulación activado), un sustrato (proenzima de un factor de coagulación) y un cofactor que actúa posibilitando la reacción. Estos componentes se ensamblan en general sobre una superficie fosfolipídica (plaquetas activadas) y se mantienen unidos por medio de puentes formados por iones Ca²⁺. Tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca desembocan en la conversión del factor X en X_a, punto en el que se inicia la vía común (**Figura I.3**).

La *vía intrínseca* recibe este nombre debido a que antiguamente se pensaba que la sangre era capaz de coagular "intrínsecamente" por esta vía sin necesidad de contar con la ayuda de factores externos. Actualmente se sabe que la vía extrínseca es la que

realmente inicia el proceso y la vía intrínseca sirve de amplificación y seguridad del proceso hemostático.

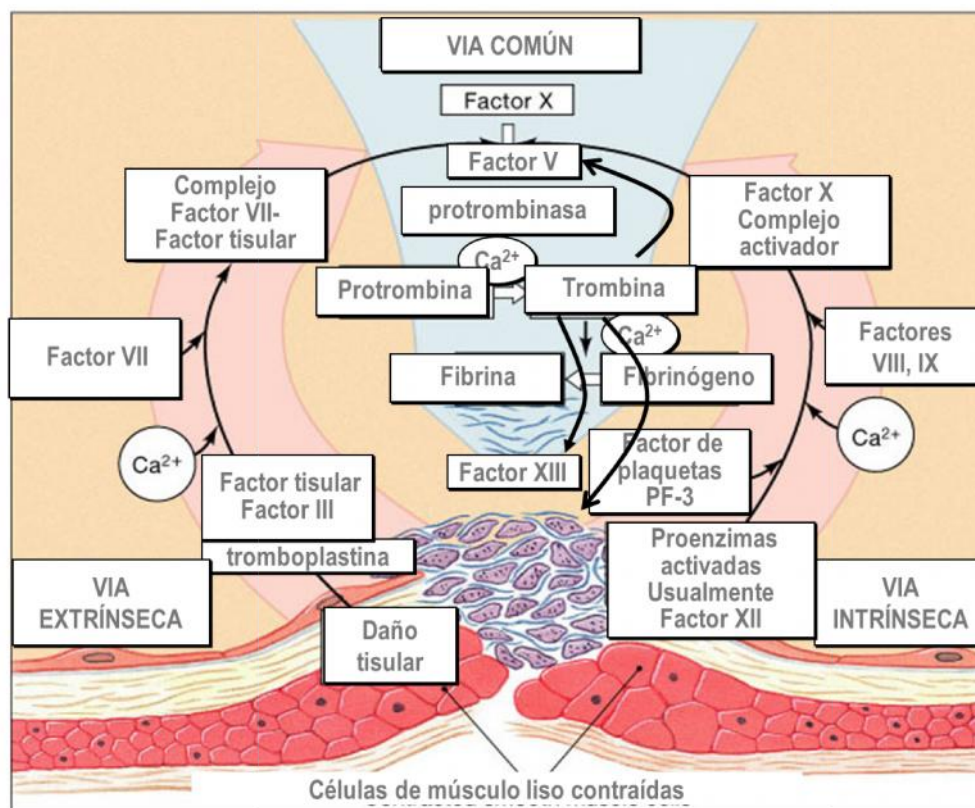
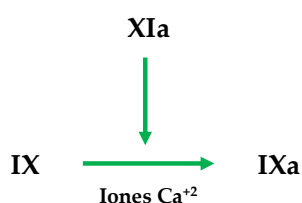


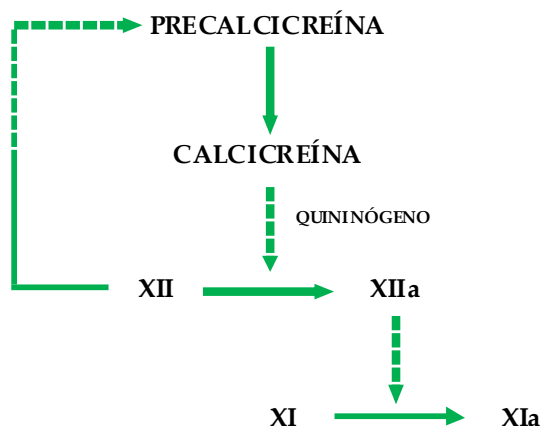
Figura I.3 Esquema condensado representando la cascada de la coagulación. Hemostasia secundaria.

El proceso de coagulación en esta vía se desencadena cuando la sangre entra en contacto con una superficie diferente al endotelio vascular, como por ejemplo el colágeno presente en la matriz subendotelial (Dubois y col., 2006). En general las superficies polianiónicas pueden actuar como desencadenantes de la reacción, tanto de materiales orgánicos como la celulosa, o inorgánicos como el vidrio, el caolín o algunas resinas.

Si comenzamos a visualizar la vía desde la formación del factor XIa, debemos mencionar la participación de las proteínas precalicreína, quinínógeno y los factores XII y XI. Esta etapa cursa sin requerir iones calcio. Estos cuatro factores se adsorben sobre superficies cargadas negativamente, como lo es la membrana basal de los vasos, formando el complejo cebador o de iniciación. De estos factores el XII funciona como verdadero iniciador, ya que si bien es

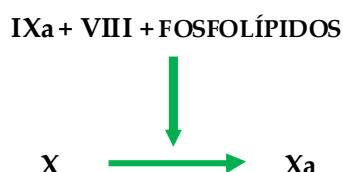


una proenzima, posee una pequeña actividad catalítica que alcanza para activar a la precalicreína convirtiéndola en calicreína. En segunda instancia la calicreína actúa catalíticamente sobre el factor XII para convertirlo en XIIa, una enzima muchísimo más



activa. La actividad catalítica de la calicreína se ve potenciada por el quininógeno. Por último la proteasa XIIa actúa sobre el factor XI para liberar XIa (Cochrane y Griffin, 1979; Bouma y col., 1980). La formación del factor IXa se produce a partir de la proenzima inactiva, por proteólisis de esta molécula catalizada

por el factor XIa en presencia de Ca^{+2} . Se liberan un péptido de 10 kDa y el factor IXa (Ratnoff y Davie, 1962). Para la obtención del factor Xa se requiere que sobre la membrana de las plaquetas se forme un complejo constituido por los factores IXa, X y VIII. Los residuos gamma-carboxiglutamato de los factores IXa y X actúan como

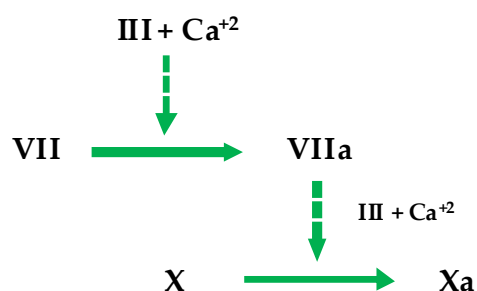


quelantes del ion Ca^{+2} , permitiendo que estos componentes formen un complejo unido por medio de puentes de iones calcio y ayudando a que el complejo se ancle a los fosfolípidos de membrana. Primero se unen los factores X y IXa a la membrana y luego se une el VIII. Finalmente, el

complejo formado por los factores IXa-X-VIII-fosfolípidos y Ca^{+2} actúa sobre el factor X para convertirlo en Xa (Fujikawa y col., 1974).

La *vía extrínseca* requiere factores ajenos a la sangre. Este hecho se conoció mucho tiempo atrás y le da el nombre a la vía. Cuando la sangre entra en contacto con tejidos lesionados o se mezcla con extractos de tejidos, se genera muy rápidamente el factor Xa. En este caso la activación de la proenzima X es mediada por un complejo formado por el factor VII, Ca^{+2} y el factor tisular (FT, factor III) unido a fosfolípidos de las plaquetas (Mackman y col., 2007).

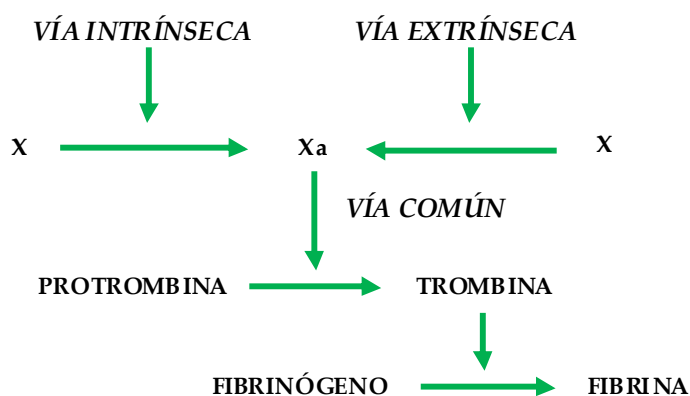
El factor tisular es una proteína de membrana sintetizada en el endotelio de los vasos sanguíneos que se encuentra presente en numerosos compartimentos celulares. El



endotelio actúa como barrera separando al factor VIIa del III y de ese modo evita la iniciación de la coagulación en ausencia de una injuria (Morrissey y col., 1993).

La vía extrínseca es muy rápida, se completa en apenas unos segundos, mientras que la intrínseca insume varios minutos. En la vía extrínseca debe formarse el factor VIIa. En primera instancia el factor VII se une a la porción fosfolipídica del FT o factor III a través de sus residuos gamma-carboxiglutamato mediante puentes de Ca^{+2} . En este complejo se produce la conversión del factor VII a factor VIIa, que es capaz de actuar sobre el factor X convirtiéndolo en la proteasa activa Xa. En este punto termina la vía extrínseca y se inicia la vía común.

En la *vía común* confluyen las vías intrínseca y extrínseca. La vía común culmina con la conversión de fibrinógeno en fibrina, y la posterior polimerización que conduce a la estabilización del coágulo. Para llegar a ese fin, debe formarse la trombina o factor IIa que se genera por proteólisis de la protrombina o factor II, catalizada por el factor Xa. La protrombina es una glicoproteína de 582 aminoácidos que presenta 12 puentes disulfuro intracatenarios (Walz y col., 1977). El factor Xa hidroliza dos uniones peptídicas de la



protrombina, reacción que se acelera notablemente por la formación de un complejo con el factor Va y Ca^{+2} sobre los fosfolípidos de las membranas plaquetarias (Krishnaswamy y col., 1986). El factor Va se produce por la acción de la trombina sobre el factor V de modo que la reacción

vaya acelerándose a medida que progresa. Este fenómeno se conoce como amplificación de la cascada de la coagulación.

Como mencionamos antes la formación de fibrina es el fin último de la hemostasia secundaria. El fibrinógeno o factor I, es una glicoproteína compuesta por seis cadenas polipeptídicas, dos cadenas α , dos β y dos γ , que se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro. Se trata de una molécula alargada y simétrica formada por tres dominios globulares conectados por segmentos fibrilares. Cada mitad de la molécula se encuentra formada por tres cadenas (α , β y γ) que se enrollan en una triple hélice muy compacta en los sectores fibrilares. Los extremos N-terminales de las cadenas α y β emergen como cabos libres del dominio globular central (Fuss y col., 2001), **Figura I.4**.

Las cadenas que conforman el fibrinógeno son muy ricas en aspartato y glutamato, y además las cadenas β poseen en esta región residuos sulfatados de tirosina que se forman por modificación postraduccion. Estos residuos con una alta tendencia a adquirir carga negativa contribuyen a formar una región central con una muy alta densidad de carga. Esta región electronegativa central es la responsable de la repulsión entre moléculas de fibrinógeno que las mantiene en solución (Fuss y col., 2001).

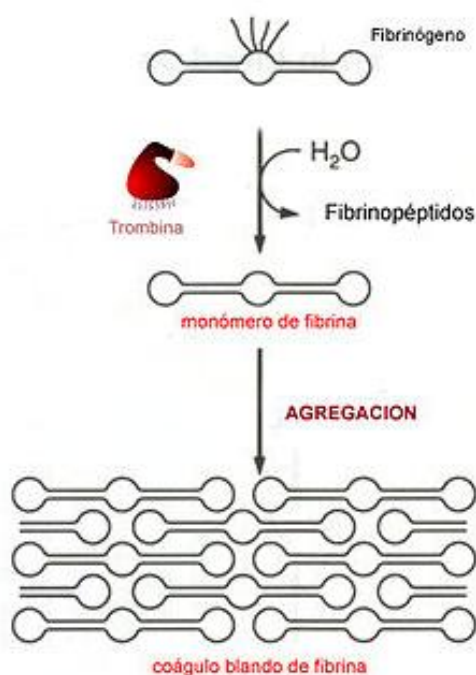


Figura I.4 Representación de la molécula de fibrinógeno, su conversión en fibrina y la polimerización de los monómeros de fibrina para formar un agregado de fibrina.

La trombina ataca los enlaces arginina-glicina presentes en los cabos libres, separando cuatro péptidos: dos segmentos A de 18 aminoácidos cada uno, provenientes de las cadenas α , y dos segmentos B de 20 aminoácidos cada uno, provenientes de las cadenas β . A estos péptidos se los suele denominar fibrinopéptidos (Fuss y col., 2001). Una vez separados los fibrinopéptidos del fibrinógeno desaparecen las fuerzas de repulsión intermoleculares permitiendo que los monómeros de fibrina resultantes se agrupen espontáneamente formando asociaciones altamente ordenadas (**Figura I.4**). Los monómeros de fibrina se disponen uno a continuación del otro, cabeza con cabeza en forma de largas hebras. Estas hebras a su vez forman manojos, emparejándose con otras de tal manera que la región central de los monómeros de fibrina de una hebra se encuentra rodeada por las cabezas de los monómeros de fibrina de las otras (**Figura I.4**). Este emparejamiento se hace posible gracias a interacciones de tipo electrostático y puente hidrógeno entre las regiones centrales de los monómeros de una molécula y las cabezas globulares de otras. Los haces paralelos de fibrina polimerizada forman una asociación laxa, que se encuentra en equilibrio con la forma monomérica de la molécula. Así, para que el coágulo formado sea estable, se debe reforzar la estructura por medio de enlaces covalentes entre hebras vecinas. Inicialmente, el entrecruzamiento se produce entre las cadenas γ de los monómeros de fibrina, y luego las cadenas α también se ven involucradas, generándose de este modo un patrón de entrecruzamiento que permite obtener fibras gruesas más fuertes. Estas fibras resultan ser más resistentes a la plasmina, enzima involucrada en la fibrinólisis (Stryer y col., 1963). La formación de los enlaces covalentes intercatenarios es catalizada por el factor XIIIa, una transglutaminasa que cataliza la formación de enlaces amida entre restos glutamina y lisina de hebras próximas entre sí (Laudano y Dolittle, 1980). Esta enzima se forma a partir del factor XIII por acción de la trombina.

La fortaleza y la elasticidad de la red de fibrina generada aumentan sensiblemente por la unión de fibronectina sobre la misma. La fibronectina es una proteína que se une a la fibrina por acción del factor XIIIa (Mosher y Johnson, 1983).

En la **Figura I.5** se encuentran resumidos los pasos más destacados de la hemostasia secundaria.

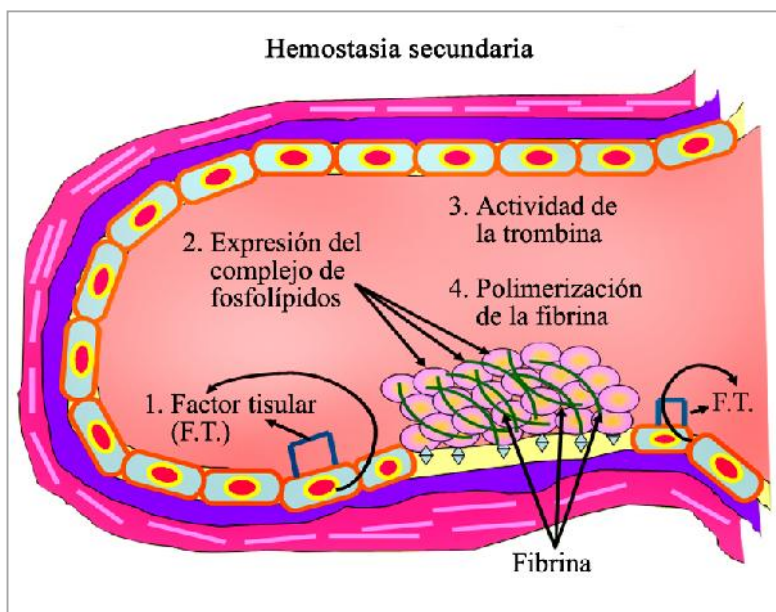


Figura I.5 Esquema simplificado de la hemostasia secundaria.

4. **Fibrinólisis:** Después de que el coágulo se ha establecido, comienza la reparación de los tejidos afectados a través del proceso de cicatrización. Para que ocurra la cicatrización el coágulo es colonizado por células que formarán nuevos tejidos y, durante el proceso va siendo degradado. La fibrinólisis es un paso esencial en la cicatrización de las heridas de los vasos, ya que durante esta función hemostática el plasminógeno se activa convirtiéndose en plasmina y degrada tanto al fibrinógeno como a la fibrina. La plasmina es una serinproteasa que hidroliza específicamente los enlaces arginina-lisina de la región triple hélice de los monómeros de fibrina (Marder y col., 1982).

1.2.2.1 Regulación de la coagulación

La cascada de la coagulación debe ser cuidadosamente regulada para mantener la fluidez de la sangre en la circulación. Existen mecanismos fisiológicos que regulan la reacción en cadena para evitar una posible trombosis descontrolada. Uno de los puntos de control es el **flujo sanguíneo** normal; el movimiento continuo de la sangre arrastra a los factores activados liberados durante el proceso de la coagulación, diluyendo su acción e impidiendo la aceleración de las vías. Esta es una de las razones por las cuales

cuando existe estasis del flujo sanguíneo se favorece la formación de trombos (Neyra y col., 1998).

El **hígado** actúa como un filtro quitando de la sangre en circulación los factores activados y los inactiva. Es capaz de remover del plasma los componentes responsables de un estado de hipercoagulabilidad a través de un sistema de macrófagos que suprimen la mayor parte de factores procoagulantes circulantes en un plazo de pocos minutos (Pérez Ruíz y col., 1997).

Algunas **proteasas** degradan específicamente a ciertos factores activados, y otras que ejercen acciones inhibitorias sobre factores activos. Entre las más importantes se encuentran la **proteína C** y la **antitrombina III**, ATIII. La proteína C es una proenzima plasmática, cuya síntesis en el hígado es dependiente de la vitamina K para su carboxilación. Esta proteína es convertida en una proteasa activa por la acción de la trombina y actúa específicamente degradando a los factores Va y VIIIa por proteólisis limitada de las cadenas pesadas de ambas moléculas, de manera de limitar la proyección de la cascada (Pérez Campo, 1994). La ATIII es una glicoproteína sintetizada en el hígado que forma un complejo equimolar estequiométrico muy fuerte, con la trombina, bloqueando la actividad proteásica (Sánchez y col., 1994). La heparina es un glicosaminoglicano polisulfonado abundante en los gránulos de los mastocitos que rodean a los vasos sanguíneos. Presenta una densidad de carga negativa que le permite unirse a restos lisina de la ATIII modificando su conformación confiriendo mayor flexibilidad en la zona del sitio activo y aumentando la capacidad de unión con la trombina (Chuang y col., 2001), aumentando unas 1000 veces la velocidad de interacción con ella y varias veces con el Factor Xa (Bjork y Lindahl, 1982). Una vez que la ATIII y la trombina se han unido, se libera la heparina que puede ser luego reutilizada.

La ATIII es responsable del 50% de la actividad antitrombínica del plasma y su importancia fisiológica está dada por la tendencia a la trombosis recurrente que presentan los pacientes con déficit congénito o adquirido de este inhibidor.

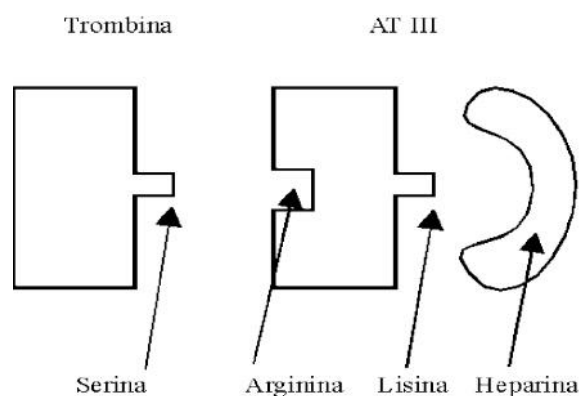


Figura I.6 Mecanismo de acción de la antitrombina III

1.2.2.2 *Trombina*

Nos detendremos brevemente en el rol que ejerce la trombina dentro del mecanismo de la hemostasia. Como vimos, cataliza la formación de fibrina y activa a la enzima responsable de su entrecruzamiento, entre algunos de sus roles destacados. El accionar de la enzima se encuentra directamente asociado a la patogenia de la trombosis, convirtiéndola en una vía importante de inhibición en el tratamiento de los procesos trombóticos. Muchas líneas de investigación apuntan específicamente a la búsqueda de compuestos que sean capaces de inhibir a la trombina. La presente tesis doctoral tiene como uno de sus principales enfoques el estudio del efecto ocasionado por péptidos provenientes de las proteínas de amaranto sobre esta enzima.

La importancia fundamental de la trombina la ha convertido en una de las proteasas más estudiadas. La trombina, como otros factores, se sintetiza en el hígado y se secreta como un zimógeno a la sangre. Comparte algunas características estructurales y su mecanismo catalítico con otras serinproteasas, como la tripsina y la quimotripsina, enzimas pancreáticas involucradas en la digestión, ya que tienen serina en el sitio activo. Sin embargo, la especificidad de la trombina respecto a sus sustratos y cofactores, al igual que su regulación espacio-temporal por parte de activadores o inhibidores, se rige por características propias de la molécula, que la distinguen de serinproteasas no específicas (Davie y Culman, 2006).

La trombina tiene un peso molecular de 32 kDa. Es una glicoproteína formada por dos cadenas polipeptídicas de 36 y 259 aminoácidos que se encuentran unidas por un puente disulfuro (Butkowsky y col., 1977). Los resultados informados en estudios funcionales y estructurales demuestran la presencia de *loops* que ocuyen parcialmente al sitio activo y establecen contactos específicos con residuos adyacentes a la unión escindida de los sustratos. Así, la especificidad de la proteasa se ve potenciada por dos exositos de unión aniónica que la constituyen y que se ven involucrados en casi todos los eventos de reconocimiento molecular en los que interviene la trombina.

El sitio activo es una profunda hendidura donde se destacan tres aminoácidos: serina, histidina y aspartato (**Figura I.7.** Obst y col., 1997). El exosito I es un sitio de unión aniónica, aunque las uniones hidrofóbicas proveen la mayor parte de la energía para establecer las interacciones, mientras que las electrostáticas están involucradas en la orientación de las superficies hidrofóbicas complementarias (Karshikov y col., 1992; Myles y col., 2001). El exosito II es también un sitio de unión aniónica, priman en él las fuerzas electrostáticas, contribuyendo las interacciones hidrofóbicas mínimamente a la energía total de unión (Karshikov y col., 1992; Myles y col., 2001).

Es interesante destacar que la activación de la función catalítica se produce cuando se unen ligandos a los exositos I o II. La unión de cualquier ligando a uno u otro de los exositos produce cambios conformacionales de tal naturaleza que hacen imposible la unión a ambos, de modo que si un ligando se une a un exosito, desplaza al ligando unido al otro. Este mecanismo es importante ya que permite a la trombina una regulación de los mecanismos de coagulación/anticoagulación.

En la **Figura I.7** se muestra a la estructura de la trombina activada. Los átomos marcados en rosa en la zona superior de la estructura son iones calcio unidos específicamente a aminoácidos glutamato carboxilados. La carga positiva de estos iones permite el ensamblaje de la proteína sobre las superficies de los vasos sanguíneos de manera que la enzima se mantenga anclada. Dado que la trombina no puede movilizarse libremente, una vez que se inicia la formación del coágulo, sólo aquellas enzimas

cercanas a la zona de injuria serán las activadas y en pocos segundos se produce la limitación del coágulo a la región de la lesión (Goodsell, 2002).

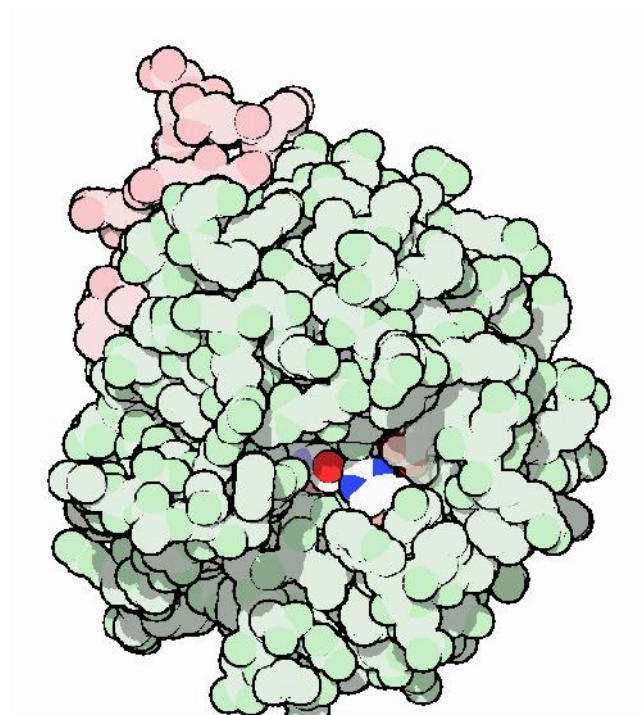


Figura I.7 Estructura de la trombina. En rojo, el átomo de oxígeno del aminoácido serina (Ser195). En azul, los átomos de nitrógeno de la histidina (His57). A la izquierda de la histidina y escondido debajo de otro aminoácido se encuentra un aspartato (Asp102).

La trombina, al igual que otras serinoproteasas, presenta preferencias sobre sustratos que contengan aminoácidos positivamente cargados. En la mayoría de los casos el aminoácido suele ser arginina.

1.3 Amaranto

1.3.1 Características del amaranto

El amaranto es considerado un pseudocereal porque sus semillas contienen cantidades importantes de almidón y son ricos en materia harinosa, al igual que las semillas de los cereales. Pertenece a la familia de las dicotiledóneas, familia *Amaranthaceae*, que son plantas con dos hojas embrionarias en sus semillas, diferentes a las monocotiledóneas gramíneas, familia a la que pertenecen los cereales como el arroz, el maíz y el trigo. Las dicotiledóneas no contienen gluten y son fácilmente digeribles, razón por la cual su consumo, sobre todo en países europeos donde la incidencia de la

enfermedad celíaca es alta, ha aumentado y se ha promovido en los últimos años. Otra ventaja de los pseudocereales es que crecen de forma rústica y se adaptan a variados ambientes, resistiendo sequías, altas temperaturas y suelos salinos (Lozoya-Gloria, 1994).

La planta puede alcanzar entre 2 y 2,5 m de altura en la madurez, presenta ramas que se ubican en el tallo principal y pueden empezar tan abajo como la base de la planta. La raíz principal es corta y las secundarias se dirigen hacia abajo, dentro del suelo. Sus flores brotan del tallo principal y en algunos casos las inflorescencias llegan a medir 90 cm de largo, pudiendo ser rectas, semirrectas o sueltas, de coloración roja, rosada, anaranjada o amarilla. Las semillas, contenidas en los frutos, son levemente lenticulares y de tamaño muy pequeño, aproximadamente 2 mm de diámetro. Se pueden encontrar semillas de diversos colores, desde el negro pasando por el rojo, hasta el marfil y el blanco (**Figura I.8**).



Figura I.8 Imágenes de hojas, flores y semillas de amaranto.

1.3.2 Algunas propiedades valiosas

El amaranto es una planta de origen americano que formaba parte de la dieta habitual de los pueblos originarios. En esos tiempos y actualmente se aprovecha ampliamente. Tanto sus semillas como sus hojas presentan alto valor nutritivo. Es capaz de realizar fotosíntesis con alta eficiencia, ya que al ser una planta C4 su mecanismo de fijación de carbono supera en eficiencia al resto de las plantas CAM y C3. Las plantas tipo C4 crecen, en general, más rápidamente y responden bien a condiciones ambientales adversas. Utilizan más eficientemente el agua consumida para formar biomasa en comparación con las plantas C3.

La semilla, además de presentar un elevado contenido de proteínas (13 al 19% p/p), muestra un buen balance aminoacídico, lo que las hace inusualmente apropiadas para el consumo humano (Bale y Kauffman, 1992). El valor nutricional de las proteínas de la semilla de amaranto es cercano al óptimo requerido para la dieta humana, según lo

detallan la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO). La cantidad de lisina que contiene es dos a tres veces superior a la de los cereales, y la cantidad de aminoácidos azufrados es superior a la de las legumbres (Segura-Nieto, 1994). El contenido de lípidos varía de 7 a 8% p/p. Rodas y Bressani (2009) han encontrado una cantidad relativamente alta de escualeno (~8% del total), el cual presenta diversos beneficios para nuestro organismo: protege de los radicales libres debido a su capacidad antioxidante, es precursor del colesterol fortaleciendo a la membrana celular y presenta acción bactericida y antifúngica.

Las partes verdes de la planta, especialmente las hojas, son ricas en minerales como K, Fe, Mg y Ca y en vitaminas A y C. La apariencia, textura y calidad nutricional de las hojas de amaranto son comparables a las de la espinaca (Segura-Nieto, 1994).

1.3.3 El amaranto en el Código Alimentario Argentino (CAA)

El Código Alimentario Argentino ha incorporado las especificaciones relacionadas con el amaranto unos pocos años atrás, en 1994. En el Capítulo XI, Alimentos vegetales, encontramos la siguiente especificación: “con el nombre de Amaranto se entienden las semillas sanas, limpias y bien conservadas de las siguientes especies de este pseudocereal: *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus hypochondriacus* L., *Amaranthus caudatus* L. y *Amaranthus mantegazzianus* Passer.”

Además especifica los siguientes valores:

- El contenido de proteínas no debe ser menor de 12,5%.
- La humedad no debe ser mayor de 12,0%.
- El contenido de cenizas debe ser menor de 3,5%.
- El contenido de almidón no debe ser menor de 60%.
- El peso hectolítrico mínimo será de 77 kg.

Los granos de amaranto, que respondan a las especies mencionadas, serán de color blanco, ámbar pálido, amarillo o castaño muy pálido, opacos o translúcidos" (CAA, Artículo 660 - Res MSyAS 80, 13.01.94).

1.3.4 Proteínas de reserva de las semillas de amaranto

Las proteínas de almacenamiento de semillas pueden clasificarse utilizando el criterio de Osborne (Osborne, 1924), que se basa en la extracción de fracciones proteicas de las harinas obtenidas con las semillas, según su solubilidad diferencial en diferentes medios. Así, las proteínas de semillas se pueden clasificar en cuatro fracciones. La fracción proteica que se extrae por solubilización en agua destilada se conoce como *albúminas*. En general corresponde a proteínas involucradas en las rutas metabólicas.

Si sobre el residuo de la extracción con agua se utiliza una solución salina diluida, se extraerán las proteínas que corresponden a la fracción *globulinas*. Una vez separadas las globulinas y utilizando sobre el residuo una solución hidroalcohólica se obtendrá la fracción conocida como *prolaminas*. Por último, utilizando soluciones de pH extremo o incorporando detergentes en el solvente de extracción, obtendremos la fracción *glutelinas*. Las globulinas, prolaminas y glutelinas generalmente corresponden a proteínas de reserva. Estas proteínas se localizan en las semillas a fin de ser utilizadas como fuente de nitrógeno en el momento de la germinación para originar una planta.

En el caso particular del amaranto, existe una fracción proteica cuantitativamente importante que se obtiene por extracción con agua destilada si se realiza luego de extraer las albúminas y las globulinas, como mencionaremos a continuación.

1.3.4.1 Albúminas de amaranto

Es la fracción que tradicionalmente se extrae de la harina debido a su capacidad de solubilizarse en agua. Está compuesta por polipéptidos de diversos tamaños la mayoría entre 10 y 43 kDa (Marcone, 2000; Segura-Nieto y col., 1992), encontrándose también algunos polipéptidos de mayor masa molecular, hasta 94 kDa (Martínez y Añón, 1996; Barba de la Rosa y col., 1992a, Konishi y col., 1991). La mayoría de los polipéptidos son monoméricos, no dissociables por 2-mercaptoetanol.

Las albúminas presentan una baja estabilidad térmica, siendo su temperatura de desnaturalización de 64°C (Martínez y Añón, 1996). En su composición poseen

principalmente aminoácidos azufrados, glutamina, ácido glutámico y glicina (Segura-Nieto y col., 1992).

La fracción de albúminas contiene proteínas con diferente función biológica. Entre estas últimas, se encuentra el inhibidor de tripsina, que ha sido purificado y secuenciado por Segura-Nieto y col. (1994).

1.3.4.2 *Globulinas de amaranto*

Se extraen del residuo de harina resultante de la extracción de las albúminas. Para extraer globulinas se utilizan soluciones salinas de pH cercano a la neutralidad. En el amaranto existen tres tipos de globulinas mayoritarias: 7S, 11S y globulina-P.

- **Globulina 7S:** Es la que se encuentra en menor proporción. Los estudios realizados por Marcone y Kakuda (1999) sobre esta fracción indican que se organiza estructuralmente formando trímeros, cuya masa molecular varía entre 150 y 200 kDa. El heteroligómero se encuentra constituido por tres subunidades de diferentes tamaños que varían entre 15 y 90 kDa, unidas de modo no covalente. Sus subunidades mayoritarias son las de 66 y 52 kDa, mientras que los polipéptidos menores resultan de la hidrólisis de la subunidad de 52 kDa (Quiroga y col., 2012). Posee baja proporción de estructura en hélice α (12,6%) y elevada proporción de estructura secundaria en hoja plegada β (50%). Su punto isoelectrico se encuentra entre 5,2 y 5,8.

- **Globulina 11S:** Esta globulina está organizada en hexámeros con masas moleculares aparentes entre 300 y 360 kDa (Marcone y col., 1998). Los hexámeros están formados por subunidades polipeptídicas de diferentes tamaños que se mantienen unidas por interacciones no covalentes (Salnikow y col., 1998). Como otras globulinas de almacenamiento de semillas de la familia de las 11S, cada una de las subunidades están formadas por un polipéptido ácido (A) y uno básico (B), unidos mediante enlaces disulfuro. La composición aminoacídica de globulina 11S parcialmente purificada fue determinada por Marcone y col. (1998) y se puede observar que los aminoácidos más abundantes son glutamina/ácido glutámico y asparagina/ácido aspártico. Contiene

relativamente alto porcentaje de estructura α hélice, (31,4%) y desordenada (41,6%), siendo el resto, hoja plegada β (Gorinstein y col., 1996).

- **Globulina P:** Es una proteína perteneciente a la familia de las 11S. Esta fracción es soluble en agua y soluciones salinas de baja fuerza iónica, pero insoluble en concentraciones de NaCl mayores que 0,1 M. Para extraerla, se utiliza agua destilada sobre el residuo que queda luego de extraer las globulinas 7S y 11S. Su pI aparente se encuentra entre 5 y 6 y su composición aminoacídica, comparada con la de albúminas, presenta mayor proporción de prolina, serina, arginina, histidina y fenilalanina, y menor de lisina, metionina, cisteína y valina. Contiene varios polipéptidos; entre ellos, algunos de masas moleculares 56, 36, 31, 26 y 22 kDa (Konishi y col., 1991). Los polipéptidos de aproximadamente 56 kDa corresponden a los precursores de polipéptidos A y B que, como en la mayoría de las globulinas 11S se sintetizan como una única cadena polipeptídica. En la globulina P, la modificación postraducciona que escinde la cadena para producir polipéptidos ácidos y básicos no se produce en todas las moléculas (Quiroga y col., 2007), lo que conduce a unidades moleculares constituidas por los precursores además de los polipéptidos A y B.

Una característica particular de esta proteína es su alto grado de polimerización, presentando aproximadamente sólo un tercio de sus moléculas no agregadas. Las unidades moleculares presentan una masa molecular cercana a 300 kDa (Martínez y col., 1997, Castellani y col., 1998, Castellani y col., 2000). Su nombre, globulina-P (GP), deriva de *globulina polimerizada*, debido a la tendencia que presenta esta fracción. La GP presenta elevada estabilidad térmica; su temperatura de desnaturalización determinada por calorimetría diferencial de barrido fue cercana a 100°C, según describe Martínez y col. (1997).

1.3.4.3 Prolaminas de amaranto

En este pseudocereal, las prolaminas se encuentran en muy baja proporción (1 al 3,2% del total de las proteínas de amaranto, Segura-Nieto y col., 1994). Respecto a su

composición aminoacídica, la leucina y la treonina son los aminoácidos esenciales más abundantes (Barba de la Rosa y col., 1992a).

Se ha descrito que esta fracción está constituida por polipéptidos de baja masa molecular (entre 10 y 22 kDa), aunque existen algunas discrepancias entre los estudios realizados que abordan cuáles son los componentes mayoritarios (Gorinstein y col., 1991; Segura-Nieto y col., 1992).

1.3.4.4 *Glutelinas de amaranto*

Las proteínas pertenecientes a esta fracción son solubles únicamente en soluciones ácidas o alcalinas. Presentan composición polipeptídica y características estructurales similares a la globulina-P (Abugoch, 2006). Se han descrito polipéptidos de masas moleculares de entre 50-67 kDa, 30-38 kDa y 20-28 kDa (Gorinstein y col., 1998; Barba de la Rosa y col., 1992a). De sus aminoácidos constituyentes, el más abundante es el ácido glutámico, después del cual se encuentran en abundancia decreciente arginina, leucina, fenilalanina y tirosina (Bressani y García-Vela, 1990).

1.4 Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos se definen como *“fragmentos proteicos exógenos específicos que producen un impacto positivo en las funciones del cuerpo humano de manera de producir finalmente un efecto benéfico sobre la salud independientemente del nutricional”*.

En las últimas décadas se ha reunido suficiente evidencia experimental que indica que las proteínas alimentarias son una fuente de péptidos bioactivos. Dichas investigaciones se han enfocado en la liberación de los péptidos, los cuales se encuentran encriptados en las proteínas, con el objeto de utilizarlos como potenciales ingredientes de alimentos funcionales (Ryan y col., 2011).

Los péptidos bioactivos afectan los principales sistemas: cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune (**Figura I.9**). Después de la digestión, los péptidos pueden ser absorbidos por el intestino para entrar de manera intacta en la circulación de la sangre y ejercer efectos sistémicos, o producir efectos locales en el tracto gastrointestinal

(Erdmann y col., 2008). Se han aislado y secuenciado péptidos con actividad opioide, quelante, anorexigénica, antimicrobiana, inmuno y citomoduladora, hipocolesterolémica, antihipertensiva, antioxidante y antitrombótica (Hartman y Meisel, 2007).

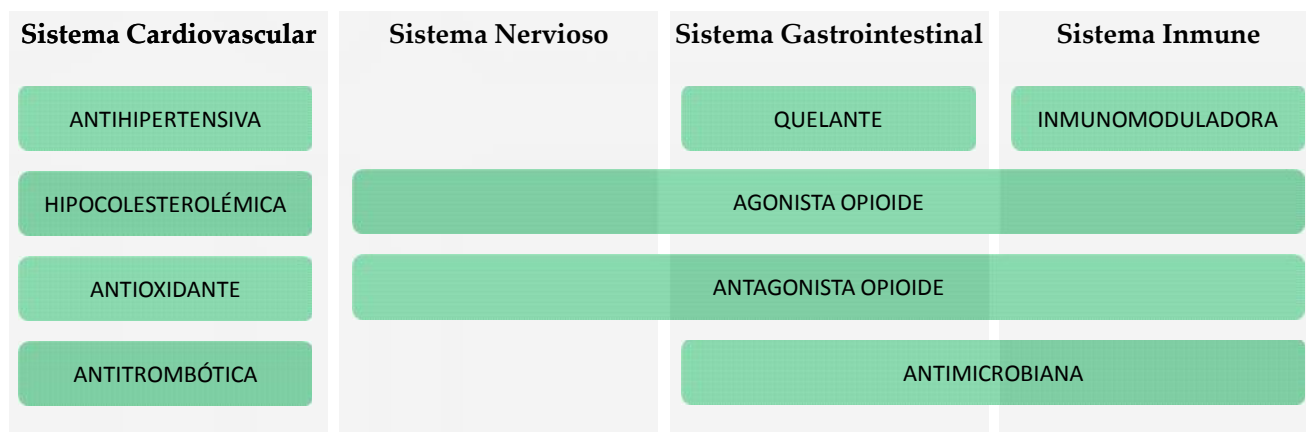


Figura I.9 Efectos de los péptidos bioactivos en los principales sistemas del organismo.

La presencia de bioactividad depende de la secuencia aminoacídica y del tamaño de los péptidos, que generalmente varía entre 2 y 20 aminoácidos, aunque en algunos casos puede consistir en más de 20 aminoácidos. Un ejemplo es lunasina, péptido con actividad antitumoral de 43 aminoácidos (De Lumen, 2005). Muchos de estos péptidos presentan propiedades multifuncionales.

Aunque las proteínas de la leche bovina y sus derivados son los precursores más frecuentes y estudiados (Fiat y col., 1993; Shah, 2000; Meisel, 2001; Gobbetti y col., 2002; Korhonen y Philanto, 2006), también se han podido caracterizar péptidos bioactivos en proteínas alimentarias provenientes de huevo, pescado, arroz, soja, trigo, carne (Vioque y col., 2000; Gobbetti y col., 2004; Hartmann y Meisel, 2007; Ryan y col., 2012). El hecho de que los biopéptidos provengan de diferentes fuentes de origen animal y vegetal, abre un campo muy interesante para revalorizar fuentes alimentarias poco explotadas así como subproductos derivados de diferentes industrias, tales como las industrias de la carne y de los alimentos marinos. El amaranto, así como otros granos de origen andino, resulta en este sentido un cultivo que reviste mucho interés, tanto por su potencial agronómico como el alto valor nutricional de sus hojas y semillas. Por otra parte en los últimos años distintos estudios han mostrado el potencial de péptidos bioactivos

encriptados en las proteínas presentes en el grano, lo que ha renovado y dado nuevo impulso a este antiguo cultivo (Escudero y col., 2005; Silva-Sánchez y col., 2008; Vecchi y Añón, 2009; Tiengo y col., 2009; Mendoza y col., 2009; Barrio y Añón, 2009; Tironi y Añón, 2010; Orsini y col., 2011; Fritz y col., 2011; Huerta-Ocampo y Barba de la Rosa, 2011; Caselato-Sousa y Amaya-Farfán, 2012). Algunas de las bioactividades descritas han sido determinadas últimamente en nuestro laboratorio. Se ha comprobado que las proteínas de amaranto son fuentes de péptidos bioactivos que se encuentran encriptados en las secuencias y presentan actividad antihipertensiva (Vecchi y Añón, 2009; Fritz y col., 2011; Quiroga y col., 2012), antioxidante (Tironi y Añón, 2010; Orsini y col., 2011) y citomoduladora (Barrio y Añón, 2009; Quiroga y col., 2014) entre otras.

1.4.1 Obtención de péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos se encuentran originalmente en la secuencia primaria de las proteínas. Pueden ser liberados mediante hidrólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal, mediante proteólisis microbiana, durante fermentaciones realizadas durante el procesamiento de los alimentos, o a través de hidrólisis enzimática *in-vitro* utilizando proteasas de diversos orígenes. Existen diferencias en los péptidos obtenidos y por consiguiente en su bioactividad, según sea la metodología empleada. La primera ocurre naturalmente en el proceso de digestión de los alimentos.

Una de las estrategias más empleadas a escala de laboratorio para la obtención de péptidos con actividad fisiológica es la hidrólisis enzimática. Se han utilizado con éxito enzimas de origen animal (tripsina, pepsina), vegetal (papaína, bromelina) y microbiano (alcalasa) solas o en combinación, para lograr una mayor degradación proteolítica (Morris Quevedo y col., 2001). Cada una de ellas requiere determinadas condiciones (pH, temperatura, tiempo, etc.) para generar como producto final perfiles peptídicos únicos.

Debido a la hidrólisis las propiedades moleculares de las proteínas cambian, produciéndose la disminución del peso molecular, el aumento de la carga y la liberación de grupos hidrofóbicos entre otros fenómenos (Caessens y col., 1999). Estos cambios moleculares pueden ser detectados con varios métodos analíticos capaces de reflejar una

o varias propiedades fisicoquímicas de las moléculas. Los cambios moleculares producen como consecuencia variaciones en las propiedades funcionales de las proteínas. Aunque el término propiedad funcional con frecuencia se aplica solamente para indicar propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados, suele utilizarse también para referir a propiedades biofuncionales. Las propiedades biofuncionales pueden ser subdivididas en nutricionales y fisiológicas. Las propiedades nutricionales de los hidrolizados reflejan por ejemplo su digestibilidad aumentada y alergenicidad disminuida cuando se los compara con las proteínas parentales. Las propiedades relacionadas con la funcionalidad biológica abarcan bioactividades potenciales del hidrolizado, las cuales se originan en la liberación de péptidos bioactivos. Finalmente, las propiedades tecnofuncionales que reflejan la funcionalidad tecnológica, son entre otras solubilidad, propiedades emulsificantes y espumantes (**Figura I.10**. Benítez y col., 2008).

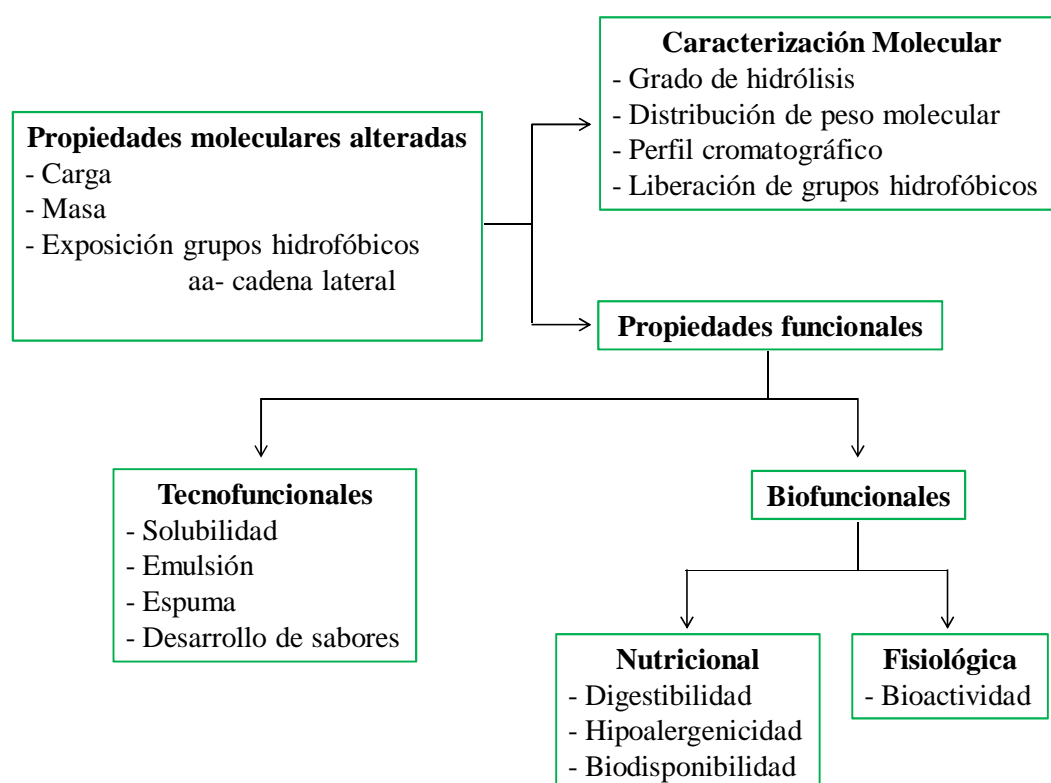


Figura I.10 Cambios en las características de la proteína originados por la hidrólisis.

El parámetro más usado para describir el resultado de un proceso de hidrólisis es el grado de hidrólisis (GH). Este parámetro se define como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos en relación a los que contiene la proteína original. Los hidrolizados que se producen en el campo de la alimentación presentan bajo grado de hidrólisis, entre 1% y 10%, cuando se hidrolizan para mejorar sus propiedades tecnofuncionales, o alto grado de hidrólisis superior al 10%, cuando se preparan para utilizarlos en alimentación especializada y/o como fuente de péptidos bioactivos (Benítez y col., 2008).

1.4.2 Biodisponibilidad de péptidos bioactivos

La funcionalidad de los péptidos bioactivos condicionará la necesidad de que sufran el proceso de absorción o que actúen sin absorberse. Por ejemplo, los péptidos anorexigénicos, que participan en la conducta alimentaria regulando el apetito, desarrollan su función en la luz intestinal. Del mismo modo, péptidos con actividad antitumoral frente a cáncer de colon, podrían también ejercer su acción sin absorberse. Otros en cambio, requieren no solamente ser absorbidos por el intestino sino, atravesar el epitelio intestinal, pasar a la circulación sistémica y dirigirse a los sitios en los que manifiesten su acción. Como ejemplos de este tipo de péptidos, podemos mencionar los antioxidantes y los antihipertensivos. Los péptidos antitrombóticos deben ser capaces de atravesar la barrera intestinal y llegar a la circulación sistémica intactos. Para eso deberán resistir las condiciones del estómago, pepsina y su bajo pH, la acción de las proteasas pancreáticas vertidas en el intestino delgado, tripsina, α -quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasas A y B, la actividad de las peptidasas de los enterocitos y la de las peptidasas séricas. Para estudiar la resistencia de los péptidos a la digestión gastrointestinal, usualmente se los somete a una digestión *in vitro*, para determinar su bioactividad una vez digeridos. En la literatura hay ejemplos que demuestran que la digestión no afecta e incluso aumenta la potencial bioactividad de los mismos (Matsui y col, 1999; Minervini y col., 2003). Aunque estos ensayos intentan repetir el camino con el que se encuentran los péptidos provenientes de proteínas alimentarias, no representan completamente el sistema real ni contempla las barreras de absorción.

Se conoce, desde hace mucho tiempo, que las proteínas se absorben como aminoácidos una vez que son totalmente digeridas. Para eso se ponen en juego varios transportadores que están involucrados en este paso, todos ellos mediante el aporte de energía, es decir transporte activo. Algunos son específicos para un aminoácido particular mientras que otros transportan grupos de aminoácidos (Kanai y Hediger, 2004; Verrey y col., 2004). El concepto de que cantidades significativas de pequeños péptidos pueden escapar de la digestión total a aminoácidos e ingresar a la circulación intactos es relativamente nuevo. Adibi (1977) describió y estudió la ruta PepT1 (*Peptide transporter 1*), a través de la cual pequeños péptidos pueden absorberse a través del epitelio intestinal. PepT1 es un transportador de oligopéptidos que funciona como un co-transportador y se ubica en las membranas del borde de cepillo del epitelio intestinal. Esta proteína juega un rol importante en la absorción y digestión de proteínas dietarias, ya que media el transporte de oligopéptidos desde el lumen hacia los enterocitos (Adibi, 1997). Además de la ruta PepT1, los péptidos pueden ser absorbidos paracelularmente. Este mecanismo serviría para péptidos altamente hidrosolubles que sean capaces de atravesar las uniones estrechas entre enterocitos, sin pasar por dentro de las células (Nellans, 1991). Otra vía posible, la difusión pasiva, podría ser utilizada por péptidos suficientemente hidrofóbicos como para atravesar la bicapa lipídica (Manson y col., 1991). Por último, otro mecanismo que puede involucrar la entrada de los péptidos es la transcitosis. La transcitosis o transporte transcelular consiste en el pasaje de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro mediante la formación de vesículas (Tuma y Hubbard, 2003). Así, la estructura particular de cada péptido determinará en última instancia la ruta preferencial de transporte (Vermeirssen y col., 2004).

La sociedad actual enfrenta la necesidad de contar con alimentos que sean más beneficiosos para la salud, que den respuesta al ya establecido crecimiento de la expectativa de vida y sean el vehículo para minimizar la aparición o agravamiento de las enfermedades crónicas que aquejan a sus integrantes. Este escenario ha sido propicio para el surgimiento de los alimentos funcionales ya varios años atrás, lo que ha representado una oportunidad real para contribuir a la mejora de la

calidad de la dieta. La directa consecuencia de estas observaciones ha sido la búsqueda continua de nuevas fuentes de sustancias bioactivas.

En ese marco y junto a los datos que demuestran que las proteínas de las semillas de amaranto presentan algunas propiedades biológicas, nos planteamos entonces el siguiente interrogante: ¿Presentarán las semillas de amaranto péptidos con actividad antitrombótica encriptados en sus proteínas?

An abstract graphic featuring three green circles of varying sizes. Each circle is surrounded by a light gray ring and a darker gray shadow, giving them a 3D appearance. Two thin green lines intersect diagonally, forming an 'X' shape that passes behind the circles. The word 'OBJETIVOS' is centered in the middle of the composition.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo fue generar conocimientos que sirvan de base para desarrollar nuevos ingredientes biológicamente activos derivados del amaranto. En el marco enunciado nos proponemos estudiar los aspectos básicos de la actividad antitrombótica de las proteínas de amaranto.

2.2 Objetivos específicos

En particular, en este trabajo se procederá a:

- Obtener proteínas de amaranto hidrolizadas mediante el empleo de proteasas comerciales, de la activación de una proteasa endógena o usando proteasas involucradas en la digestión gastrointestinal, estableciendo condiciones que nos permitan conseguir aislados proteicos con elevado grado de hidrólisis.
- Estudiar el efecto del pH, temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad de la proteasa endógena que acompaña a las proteínas en los aislados proteicos de amaranto.
- Caracterizar las proteínas presentes en los aislados proteicos de amaranto, o en fracciones separadas según su solubilidad en diferentes medios y los hidrolizados proteicos obtenidos, tanto en aspectos estructurales como fisicoquímicos.
- Evaluar los efectos de aislados de amaranto, sus fracciones proteicas y sus hidrolizados sobre la coagulación empleando diversas metodologías *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.
- Separar los péptidos o polipéptidos biológicamente activos.
- Analizar la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos obtenidos, estimando su absorción a través del tracto gastrointestinal empleando ensayos con cultivos celulares.
- Secuenciar los péptidos bioactivos encontrados y realizar estudios *in silico* para evaluar sus posibles mecanismos de acción.

The image features a minimalist design with three green circles of varying sizes. Each circle is surrounded by a light gray shadow, giving it a 3D effect. Thin green lines extend from the top-left and top-right corners towards the circles. The text 'MATERIALES Y MÉTODOS' is centered in a bold, black, serif font.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y muestras de amaranto

3.1.1 Semillas de amaranto

En este trabajo se utilizaron semillas de *Amaranthus mantegazzianus* pass c.v. Don Juan cosechadas en el año 2010 en la Estación Experimental Agropecuaria Anguil del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), La Pampa, Argentina. También fueron empleadas semillas de *Amaranthus hypochondriacus* c.v. Mercado cosechadas en el año 2011 en Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

3.1.2 Obtención de la harina de amaranto

Las semillas enteras se molieron en un molino ciclónico, utilizando una malla de 1 mm. Para algunas experiencias la harina obtenida se tamizó en la cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, utilizando un cedazo de malla de 92 micrones, mientras que en otros ensayos se continuó con la harina sin tamizar.

En todos los casos la harina obtenida fue desgrasada mediante extracción con n-hexano, en una relación 10% p/v. La extracción se realizó durante 5 horas con agitación a temperatura ambiente y durante 19 horas en reposo, completándose 24 horas de contacto entre la harina y el solvente. Para separar el solvente se realizó una filtración a temperatura ambiente empleando una bomba de vacío, completando la separación del hexano por evaporación manteniendo el sólido a temperatura ambiente bajo campana durante 12 horas. La harina desgrasada obtenida se almacenó en recipientes herméticos a 4°C hasta su uso.

3.1.3 Preparación de los aislados proteicos

Los aislados proteicos de amaranto fueron obtenidos de acuerdo a lo propuesto por Martínez y Añón (1996). El esquema de preparación se muestra en la **Figura M.1**. La harina desgrasada de amaranto se suspendió en agua destilada, en una relación 10% p/v.

La extracción de las proteínas se realizó ajustando el pH a 9,0 con NaOH 2,0 N y agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 9000g a 10°C durante 20 minutos, descartando el precipitado. El sobrenadante obtenido se ajustó a pH 5,0 con HCl 2,0 N con el fin de precipitar las proteínas presentes al alcanzar su punto isoeléctrico. Para separarlas se centrifugó la dispersión a 9000g a 4°C durante 20 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en agua destilada y se neutralizó con NaOH 2,0 N. Finalmente se congeló a -80°C y se liofilizó. El sólido obtenido fue molido y almacenado a 4°C en recipientes herméticos hasta su uso.

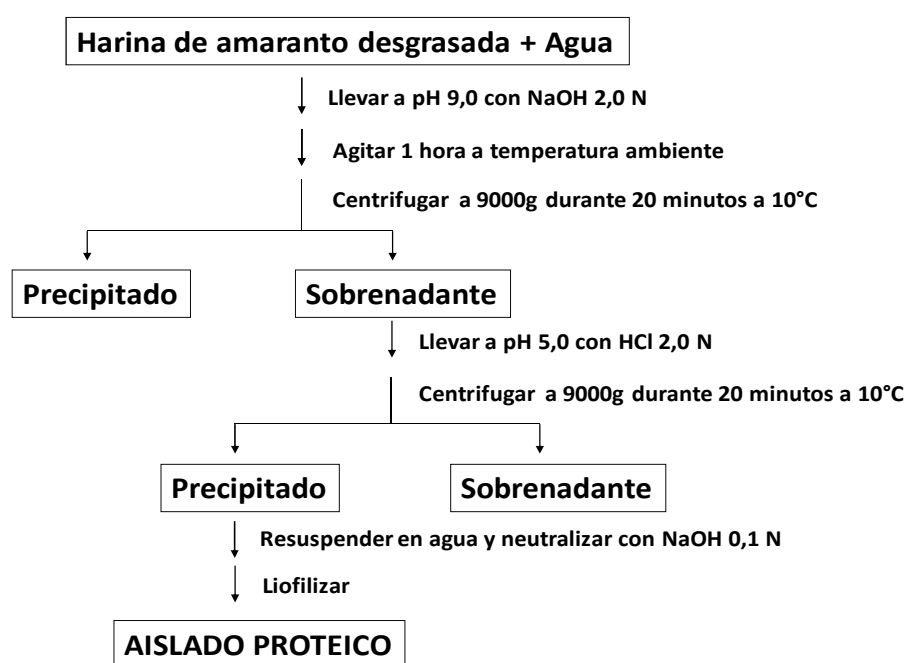


Figura M.1 Esquema de preparación de aislados proteicos de amaranto.

3.1.4 Obtención de las fracciones proteicas

Para obtener fracciones proteicas a partir de la harina desgrasada, se realizó una extracción secuencial siguiendo el método de extracción de Konishi y col. (1991) con algunas modificaciones realizadas por Martínez y col. (1997). El esquema de obtención se muestra en la **Figura M.2**. A fin de maximizar la cantidad de cada fracción obtenida se realizaron tres extracciones con cada solvente utilizado, a temperatura ambiente, manteniendo el sólido en contacto con el solvente durante 60 minutos en la primera extracción y durante 30 minutos en las dos siguientes. La relación de extracción

harina/solvente fue de 10% p/v. La secuencia de extracción de las proteínas y los solventes empleados para cada etapa se detallan a continuación.

3.1.4.1 Albúminas

La fracción albúminas se obtuvo utilizando agua destilada como solvente de extracción. La dispersión se agitó a temperatura ambiente y una vez finalizado el tiempo de contacto especificado se realizó la separación del residuo mediante centrifugación a 9000g y 20°C durante 20 minutos. Los tres extractos obtenidos se juntaron y se ajustó el pH a 5 con HCl 2,0 N para producir la precipitación isoelectrica de la proteína presente. El precipitado se separó por centrifugación a 9000g y 4°C durante 20 min, se resuspendió en agua destilada y se neutralizó con NaOH 0,1 N. Luego se congeló a -80°C, para posteriormente liofilizar la preparación. El sólido obtenido fue molido y almacenado en recipientes herméticos a 4°C hasta su uso.

3.1.4.2 Globulinas

Para obtener la fracción globulinas se empleó el mismo procedimiento que para la fracción albúminas, utilizando el residuo de la extracción anterior. Se utilizó como solvente un buffer salino que contiene K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM y NaCl 0,4 M, y pH 7,5.

3.1.4.3 Globulina P

En este caso, el solvente de extracción fue nuevamente agua destilada, pero se utilizó el residuo resultante de la extracción de globulinas. La fracción globulina P (Gp) se obtuvo por precipitación isoelectrica a pH 6.

3.1.4.4 Glutelinas

Se empleó el mismo procedimiento que para las tres fracciones anteriores con el residuo de la harina obtenido de la extracción de Gp, utilizándose como solvente de

extracción buffer borato de sodio 0,1 M, pH 10 y ajustando el pH a 6 para precipitar la fracción glutelinas.

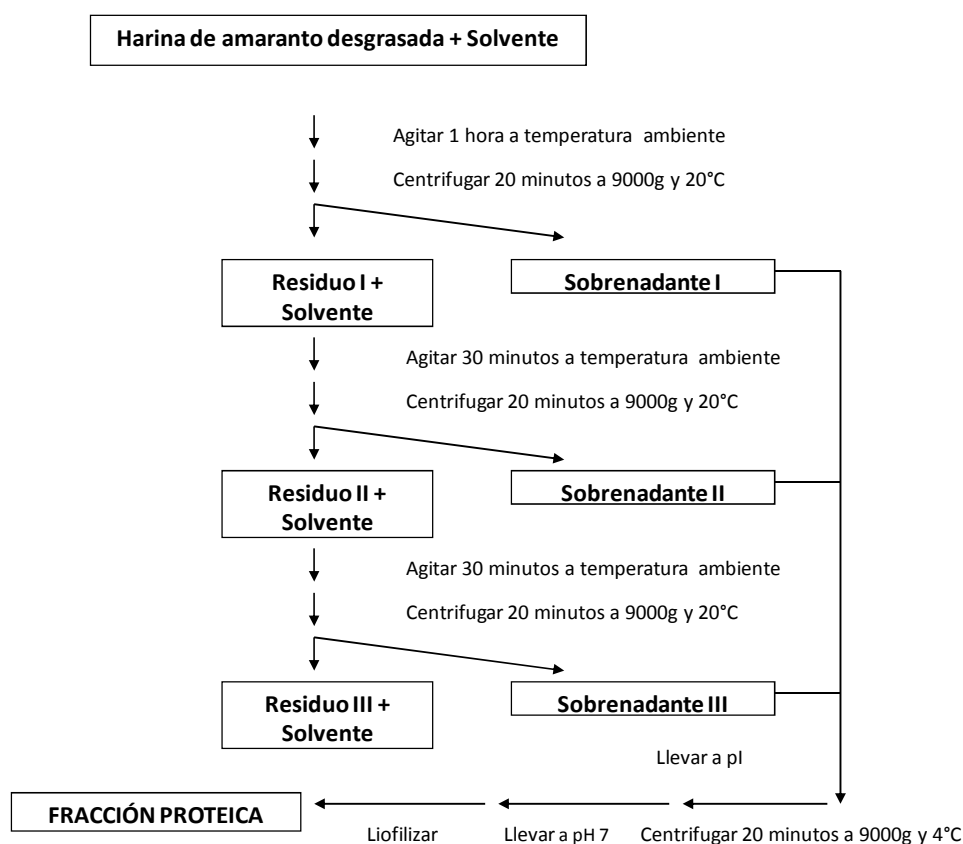


Figura M.2 Esquema de obtención de las fracciones proteicas de amaranto.

3.1.5 Preparación de los hidrolizados proteicos de amaranto

3.1.5.1 Hidrolizados proteicos preparados por activación de una proteasa endógena

En nuestro laboratorio se ha detectado la presencia de una proteasa aspártica endógena en los aislados proteicos de amaranto (Ventureira y col., 2012). La activación de esta proteasa nos permitiría obtener hidrolizados sin adición de enzimas exógenas. Con el fin de encontrar las condiciones para obtener la máxima hidrólisis del aislado por acción de tal enzima, se realizaron ensayos en los que se variaron pH, temperatura y tiempo de incubación.

I. Selección del pH para obtener hidrolizados de amaranto

El aislado proteico se suspendió en agua destilada al 2% p/v y se incubó durante 15 minutos a 37°C en un agitador orbital con termostato a una velocidad de 400rpm. La preparación se dividió en alícuotas a las cuáles se les ajustó el pH con HCl 1,0 N, entre

1,5 y 4,0, con variaciones de 0,5 unidades de pH. Las mezclas de reacción se incubaron durante 3 horas a 40°C con agitación constante. La reacción de hidrólisis se detuvo por calentamiento de la mezcla de reacción a 95°C durante 10 minutos. Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

II. Selección de la temperatura de reacción para obtener hidrolizados de amaranto

El aislado proteico se suspendió en agua destilada (2% p/v) y se incubó durante 15 minutos a 37°C en un agitador orbital con termostato a una velocidad de 400rpm. Luego se ajustó el pH con HCl 1,0 N, se separó en alícuotas y se incubaron durante 3 horas a distintas temperaturas: temperatura ambiente (25°C), 40°C, 55°C y 65°C con agitación constante. La reacción de hidrólisis se detuvo por calentamiento de la mezcla de reacción a 95°C durante 10 minutos. Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

III. Selección del tiempo de reacción para obtener hidrolizados de amaranto

El aislado proteico se suspendió en agua destilada (2% p/v) y se incubó durante 15 minutos a 37°C en un agitador orbital con termostato a una velocidad de 400rpm. Luego se ajustó el pH con HCl 1,0 N y se separó en alícuotas, las cuáles se incubaron a la misma temperatura durante distintos tiempos: 1, 3, 5, 7 y 16 horas, con agitación constante. La hidrólisis se detuvo por calentamiento de la mezcla de reacción a 95°C durante 10 minutos. Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

IV. Obtención del hidrolizado proteico de amaranto

Una vez establecidas las condiciones de pH, temperatura y tiempo de incubación adecuadas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, se procedió a preparar el hidrolizado proteico. Para obtener una masa adecuada de proteínas hidrolizadas se mantuvo la relación sólido:agua destilada (2% p/v) pero se preincubó durante una 1,5 horas a 37°C en un agitador orbital con termostato a una velocidad de 400rpm, a fin de asegurar el equilibrio térmico. Luego se ajustó el pH con HCl 1,0 N y se incubó la mezcla de reacción a la temperatura y tiempo seleccionados manteniendo agitación constante. La reacción de hidrólisis se detuvo por alcalización de la mezcla de reacción llevándola a pH 9 con NaOH 2,0 N. En los ensayos que permitieron establecer las condiciones de

reacción con las que se trabajó finalmente se detuvo la reacción por calentamiento. En estos casos el volumen de las alícuotas permitía que el aumento de la temperatura fuese casi instantáneo, a diferencia de lo que sucede al trabajar con volúmenes mayores, en los que para asegurar la inactivación de la enzima de manera inmediata, se optó por llevar la dispersión a pH alcalino en el cual la proteasa no es activa. Los hidrolizados así preparados fueron posteriormente congelados a -80°C y liofilizados. Los hidrolizados obtenidos se molieron y almacenaron a 4°C en recipientes herméticamente cerrados hasta su utilización.

3.1.5.2 Hidrolizados proteicos preparados por adición de proteasas comerciales: alcalasa y tripsina

Para obtener hidrolizados proteicos, el aislado nativo y las fracciones se dispersaron en agua destilada 1% p/v, ajustando el pH a 10 con NaOH 2,0 N. Las dispersiones obtenidas se mantuvieron en agitación constante durante 1 hora a 37°C en un agitador orbital con termostato. Luego de esta preincubación, se agregó la enzima alcalasa, en una relación 0,08 μl de la enzima comercial por mg de aislado, y se incubó la mezcla de reacción durante 20 minutos a 37°C . La alcalasa utilizada es una proteasa bacteriana proveniente de *Bacillus licheniformis*, marca Sigma (2,4 Unidades Anson/g). Una vez pasado el tiempo estipulado se agregó la enzima tripsina en una relación 0,01 mg enzima comercial por mg de aislado, y la mezcla de reacción se incubó durante 20 minutos más. La tripsina utilizada es una proteasa de tipo III de páncreas bovino, provista por Sigma (0,05 Unidades BTEE/mg sólido). La reacción de hidrólisis se detuvo por calentamiento a 85°C durante 10 minutos en baño de agua. Posteriormente cada preparado se congeló a -80°C y se liofilizó. Los hidrolizados obtenidos se molieron y almacenaron a 4°C en recipientes herméticamente cerrados hasta su utilización.

Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de proteólisis con el objetivo de estudiar la cinética de reacción y realizar un seguimiento de la misma. Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

3.1.5.3 *Hidrolizados proteicos obtenidos por digestión gastrointestinal simulada*

El aislado nativo se sometió a digestión gastrointestinal simulada empleando el protocolo Roesler y Rao (2001) con algunas modificaciones. El aislado proteico se suspendió en una solución salina de NaCl 0,03 M, en relación 2,5% p/v de proteína. El pH se ajustó a 2 adicionando HCl 1,0 N. Luego de termostatar la suspensión proteica durante 30 minutos a 37°C, se agregó pepsina en una relación 0,1 g pepsina/g de proteína y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación de 100rpm en un agitador orbital con termostato. Una vez finalizado el tiempo de reacción con pepsina, se ajustó el pH de la suspensión a 6 con NaOH 1,0 N y se agregó pancreatina en una relación 0,1 g pancreatina/g de proteína. Se incubó durante 1 hora a 37°C y 100rpm en el agitador orbital y finalmente se detuvo la hidrólisis por calentamiento de la mezcla de reacción a 85°C durante 10 minutos en baño de agua.

Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de proteólisis con el objetivo de estudiar la cinética de reacción y realizar un seguimiento de la misma. Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -20°C hasta su análisis.

Reactivos

Solución de pepsina: Pepsina comercial MP Biomedicals 1:15000 5X unidades NF. Se disolvieron 0,4 g de pepsina 1:15000 en 2,5 ml de solución de HCl 0,1 N y NaCl 0,03 M. La solución se incubó a 37°C durante 30 minutos con agitación antes de utilizarla.

Solución de pancreatina: Pancreatina porcina comercial MP Biomedicals 4X-100 USP unidades/mg. Se solubilizaron 0,1 g de pancreatina en 25 ml de NaHCO₃ 0,1 N y se incubó 30 minutos a 37°C con agitación antes de utilizarla.

3.2 Caracterización de las muestras

3.2.1 Composición centesimal de las muestras

3.2.1.1 *Determinación de proteína total*

I. Método de Kjeldahl

El contenido de proteínas de los aislados y sus respectivos hidrolizados se determinó mediante el método de Kjeldahl (AOAC, 1984). Para convertir el nitrógeno en

proteínas se utilizó como factor de conversión 5,85 g proteína/g de nitrógeno, que es el más acorde para las proteínas de amaranto (Becker y col., 1981; Paredes-López, 1994).

II. Método de microKjeldahl

El contenido de proteínas de las fracciones proteicas se determinó empleando el método de microKjeldahl, que permite utilizar una menor cantidad de muestra para su cuantificación.

La digestión de las muestras se realizó en un tubo digestor, de modo similar al utilizado en el método Kjeldahl tradicional, agregando 1 g de mezcla catalizadora, preparada con 10 g de Na_2SO_4 y 1 g de CuSO_4 , y 3 ml de H_2SO_4 concentrado. Los tubos se colocaron en un digestor y se procedió a calentarlos durante el tiempo necesario hasta que se observase una solución traslúcida y color verde en los tubos. Una vez finalizado el proceso, el contenido de los tubos se trasvasó a matraces de 50 ml y se completó el volumen con agua destilada. Por último, el amonio formado se cuantificó por el método colorimétrico descrito por Nkonge y Balance (1982).

Además de digerir seroalbúmina bovina para construir la curva de calibración, en la etapa de digestión se incluyeron dos tubos con controles o estándares de nitrógeno. Uno de los tubo contenía $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el otro contenía urea, ambos de grado analítico, que permitieron corroborar la cantidad de nitrógeno detectado por la colorimetría. Ambas sustancias utilizadas como control fueron secadas durante varias horas en estufa a 105°C y cuidadosamente pesadas una vez frías, a fin de conocer exactamente el contenido de nitrógeno que aportan y evaluar a partir de los datos obtenidos la exactitud del método. La lectura de la absorbancia a 660 nm permitió calcular la concentración de nitrógeno en las muestras y convertir el nitrógeno a proteínas para lo cual se utilizó el factor de conversión antes mencionado (5,85 g proteína/g nitrógeno, Becker y col., 1981; Paredes-López, 1994).

3.2.1.2 Determinación del contenido de minerales

La determinación del contenido de minerales se realizó mediante la obtención de las cenizas de la muestra por pesada del residuo de la calcinación. Las muestras se

colocaron en cápsulas de porcelana taradas, se carbonizaron por acción de la llama y finalmente se calcinaron en una mufla a 550°C hasta cenizas blancas. La cantidad de cenizas de la muestra se calculó por diferencia de peso entre la cápsula con las cenizas y la cápsula vacía, y se refirió a la masa inicial de muestra para calcular el porcentaje de las mismas.

3.2.1.3 *Determinación del contenido de humedad*

La determinación de humedad se realizó utilizando el método indirecto (AOAC, 1990). Para ello las muestras se colocaron en recipientes limpios y tarados en estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ y presión atmosférica, hasta alcanzar peso constante. La humedad porcentual se calculó determinando la cantidad total de agua perdida por parte de la muestra. Ésta se calculó por diferencia de peso antes y después de haberla colocado en la estufa, y calculando el porcentaje de la misma respecto a su peso inicial.

3.2.1.4 *Determinación del contenido de hidratos de carbono*

El contenido de hidratos de carbono se determinó por el método colorimétrico de la antrona (Loewus, 1952). Con el fin de mejorar la homogeneidad de las muestras, se las sometió, antes del ensayo colorimétrico, a una hidrólisis ácida con HCl 12,0 M a ebullición durante 2 horas a reflujo.

Para la realización de la curva de calibración se utilizaron diluciones adecuadas de glucosa patrón marca Sigma. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm.

3.2.2 *Determinación del grado de hidrólisis (GH%)*

Para calcular el grado de hidrólisis de los hidrolizados preparados, se determinaron los grupos amino libres utilizando los métodos que se describen a continuación.

3.2.2.1 Método del ácido trinitrobencenosulfónico

El método del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) fue descrito por Adler-Nissen en 1979.

Reactivos

Buffer del ensayo: buffer fosfato 0,2125 M, pH 8,2.

Buffer del ensayo con SDS: buffer fosfato 0,2125 M, 1% p/v SDS, pH 8,2.

TNBS: Reactivo TNBS (Sigma) previamente diluido en agua destilada, 1:200.

El procedimiento seguido en el método TNBS se encuentra esquematizado en la **Figura M.3**. La curva de calibración se realizó utilizando leucina (Sigma) y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 340 nm.

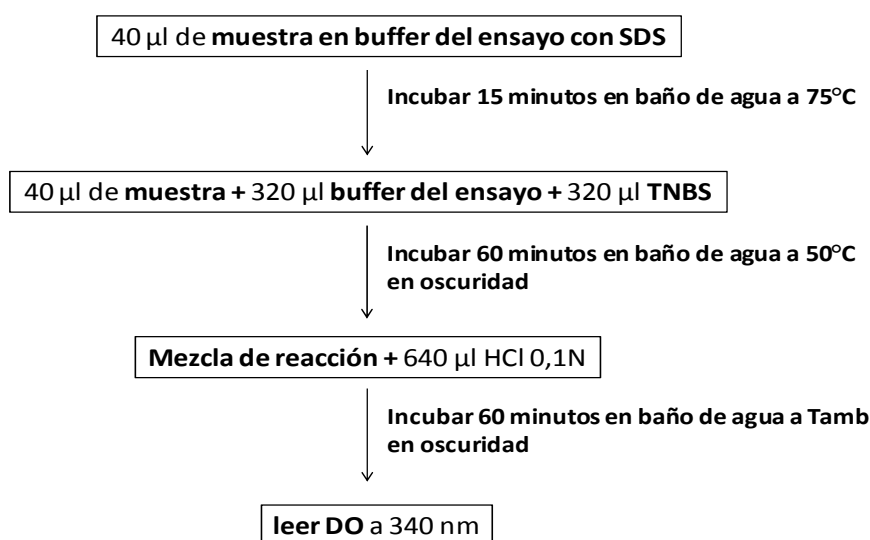


Figura M.3 Esquema experimental para el método de TNBS.

El grado de hidrólisis fue calculado con la siguiente expresión:

$$GH\% = \frac{(NH_{2t} - NH_{2t=0})}{NH_{2\text{ totales}}} \times 100$$

donde,

NH_{2t} : grupos amino libres de la muestra, a tiempo de hidrólisis t

$NH_{2t=0}$: grupos amino libres de una muestra sin hidrolizar, a *tiempo cero* de hidrólisis

$NH_{2\text{ totales}}$: grupos amino totales presentes en la proteína

$$\text{NH}_2 \text{ totales} = \text{NH}_2 \infty - \text{NH}_2 \text{ t=0}$$

$\text{NH}_2 \infty = (1/\text{PM}_{\text{aa promedio}}) \times (1 + f_{\text{LYS}}) \times C_{\text{prot}}$ Corresponde a los grupos amino libres de una muestra completamente hidrolizada

$\text{PM}_{\text{aa promedio}}$: promedio de los pesos moleculares de los aminoácidos de las proteínas de la muestra. Para las proteínas de amaranto se considera 130 g/mol

f_{LYS} : proporción de lisina en las muestras (1/15) (Bresani, 1994)

C_{prot} : concentración de la muestra utilizada en el ensayo (g/L)

3.2.2.2 Método del ortoftaldehído

El grado de hidrólisis se determinó dosando los grupos amino libres mediante el método del ortoftaldehído (OPA) descrito por Nielsen y col. (2001) y Dinnella y col. (2002), con algunas modificaciones realizadas como describen Cian y col. (2012).

Reactivos

Buffer del ensayo: Borato de sodio 0,15 M, 0,15% p/v SDS, pH 9,5.

Reactivo OPA: OPA 5,97 mM en el buffer de ensayo, ditioneitol (DTT) 5,7 mM.

La curva de calibración se construyó, al igual que en el método de TNBS a partir de una solución de leucina (Sigma) 1 mg/ml. La reacción consiste en adicionar 750 µl del reactivo de OPA sobre 100 µl de la muestra, agitar durante 5 segundos, dejar reposar 2 minutos y finalmente medir la absorbancia a 340 nm, para lo cual se utilizó un lector de placas.

El grado de hidrólisis se calculó con la expresión previamente presentada para el método de TNBS.

3.2.3 Determinación de la composición polipeptídica de las muestras de amaranto. Electroforesis

A fin de conocer la composición polipeptídica de las muestras de amaranto se realizaron electroforesis desnaturalizantes (SDS-PAGE), desnaturalizantes en

condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE+2-ME), Tricina-SDS-PAGE y tricina en condiciones reductoras Tricina-SDS-PAGE+2-ME.

Muestras

Las muestras se prepararon disolviendo la proteína liofilizada en buffer de muestra (5-10 mg/ml) o, cuando se trataba de soluciones o dispersiones proteicas, mezclando convenientemente las mismas con buffer de muestra 4x.

En las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras las muestras fueron tratadas a 100°C durante un minuto en presencia de 2-mercaptoetanol (2-ME).

Todas las muestras, antes de ser colocadas en el gel correspondiente, se centrifugaron a 14000g durante 10 minutos a 20°C en una microcentrífuga, y los sobrenadantes se sembraron a razón de 20-30 µg de proteína/calle, cuando se realizó la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250, o de 1-2 µg de proteína/calle cuando se realizó la tinción con nitrato de plata.

Patrones

Se utilizaron diferentes patrones de masa molecular. Para las electroforesis SDS-PAGE se usaron patrones de bajo peso molecular (LMW) marca GE Health Care, que incluye las siguientes proteínas: fosforilasa b (94 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). Para las electroforesis de Tricina-SDS-PAGE se emplearon además de los LMW, patrones de muy bajo peso molecular (VLMW) marca BIO-RAD. Las proteínas incluidas en esta mezcla son: triosa-fosfato isomerasa (26,6 kDa), mioglobina (16,95 kDa), α -lactoalbúmina (14,4 kDa), aprotinina (6,51 kDa), cadena β de la insulina (3,5 kDa) y bacitracina (1,4 kDa).

Reactivos

➤ SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME

- **Buffer de electrodo:** hidroximetil aminometano-HCl (Tris-HCl) 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,3, con dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% p/v.
- **Buffer de gel apilador:** Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, con SDS 0,1% p/v.
- **Buffer de gel separador:** Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, con SDS 0,1% p/v.

- **N',N',N',N'tetrametiletilendiamina (TEMED):** concentración final 0,1% v/v, adicionado en gel separador y apilador.
- **Persulfato de amonio** al 10% (p/v): Concentración final 0,4% v/v en gel apilador y 0,06% v/v en gel separador.
- **Buffer de muestra:** Tris-HCl 0,185 M, pH 8,8, glicerol 12,5% v/v, SDS 0,1% p/v, y azul de bromofenol 0,05% p/v con o sin 2-ME 5% v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.

➤ Tricina SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE+ 2-ME

- **Buffer de electrodo anódico:** Tris 0,2 M, pH 8,9.
- **Buffer de electrodo catódico:** Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 0,1% p/v, pH 8,25.
- **Buffer de gel:** Tris 3M, SDS 0,3% p/v, pH 8,45.
- **Solución AB₃:** 48 g acrilamida + 1,5 g bisacrilamida en 100 ml de solución.
- **Solución AB₆:** 46,5 g acrilamida + 3 g bisacrilamida en 100 ml de solución.
- **N',N',N',N'tetrametiletilendiamina (TEMED):** se agregó en la preparación de los distintos geles a una concentración final de 0,1% v/v.
- **Persulfato de amonio** al 10% p/v. Se coloca durante la preparación de los geles en concentración final 0,075% v/v en gel apilador, 0,05% v/v en gel espaciador y 0,03% v/v en gel separador.
- **Buffer de muestra:** Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, glicerol 12% p/v, SDS 4%, Serva blue-G 0,01% p/v, pH 6,8, con o sin 2-mercaptoetanol 5% v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.
- **Solución fijadora:** agua/metanol/ácido acético (40:50:10).

Desarrollo de los geles y condiciones de corrida

Las electroforesis se realizaron en miniplacas (10 cm x 7 cm x 1 mm) en un equipo BIO-RAD, modelo mini-protean II.

➤ SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME

Se utilizaron geles de concentración 12% p/v de acrilamida para el gel separador, y de 4% p/v para el gel apilador, en la parte superior. Se utilizó el sistema de buffers descrito por Laemmli (1970) y detallado con anterioridad. Las corridas se realizaron a

un voltaje constante de 200V, requiriendo aproximadamente 1 hora y 30 minutos para completar la corrida. El voltaje máximo admitido fue 200V.

➤ Tricina-SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE+2-ME

Se siguió el sistema discontinuo de Schägger (1987) formado por tres regiones:

- Gel apilador: 0,0825 ml solución AB3/ml solución gel.
- Gel espaciador: 0,2 ml solución AB3/ml solución gel.
- Gel separador: 0,33 ml solución AB6/ml solución gel.

Las corridas se realizaron a voltaje constante, 30V, hasta que las proteínas atravesaron el gel apilador. Luego la diferencia de potencial se aumentó a 90V requiriéndose entre 4 y 5 horas para completar las corridas.

Fijación, coloración y decoloración

➤ SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME

Una vez concretada la corrida los geles fueron fijados y teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 durante 12 horas y luego decolorados en solución decolorante a temperatura ambiente.

➤ Tricina-SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE+2-ME

Los geles se colocaron en la solución fijadora una vez finalizada la corrida durante 45 minutos, luego se le adicionó la solución colorante con Coomassie Brilliant Blue R-250 durante 12 horas y finalmente se decoloraron a temperatura ambiente durante 2 horas, cambiando el decolorante frecuentemente.

Reactivos para tinción con Coomassie

- **Solución colorante:** Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,192% p/v disuelto en agua/metanol/ácido acético (10:10:4).
- **Solución decolorante:** mezcla agua/etanol/ácido acético (65:25:10).

En los casos en los que se realizó la **tinción con plata** se siguió el protocolo descrito por Blum y col. (1987). Se procedió colocando los geles durante 5 minutos en la solución fijadora. Posteriormente se lavaron y enjuagaron varias veces con agua bidestilada. Después se colocaron en las soluciones para realizar los pretratamientos A y B durante 5 minutos y 1 minuto, respectivamente. Una vez enjuagados se colocaron en la

solución de impregnación durante 8 minutos. Después de enjuagarlos nuevamente se agregó la solución reveladora durante el tiempo necesario para revelar la imagen (60 segundos aproximadamente) y se detuvo la reacción manteniendo los geles en contacto con ácido acético glacial 1% (v/v) durante 60 segundos.

Reactivos para tinción con plata

- **Solución fijadora:** 60 ml de 50% v/v acetona, 1,5 ml de 50% p/v TCA y 25 μ l de 37% v/v formaldehído.
- **Solución de pretratamiento A:** 50% v/v acetona.
- **Solución de pretratamiento B:** 100 μ l de 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en 60 ml de agua bidestilada.
- **Solución de impregnación:** 0,8 ml de 20% p/v AgNO_3 , 0,6 ml de 37% v/v formaldehído y 60 ml de agua bidestilada.
- **Solución de revelado:** 1,2 g de Na_2CO_3 , 25 μ l de 37% v/v formaldehído, 25 μ l de 10% p/v $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y 60 ml de agua bidestilada.
- **Solución de detención (Stop):** 1% v/v ácido acético glacial.

Obtención de imágenes y análisis de los geles

Para procesar los geles, las imágenes se digitalizaron utilizando una scanner. Empleando el programa Image J, se obtuvieron las distancias recorridas por las proteínas patrón de masa molecular y, utilizando la mejor relación entre dicha distancia y su peso molecular, se obtuvieron las rectas que permitieron estimar los pesos moleculares de los polipéptidos de las muestras.

3.2.4 Análisis por cromatografía

La cromatografía fue utilizada en este trabajo con fines de caracterización, de separación o de purificación de muestras proteicas de amaranto.

3.2.4.1 Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)

Durante la ejecución de este trabajo se utilizó cromatografía FPLC de exclusión molecular, que permite separar especies proteicas por el tamaño que presenten.

Se utilizaron dos columnas de exclusión molecular pre-empacadas marca Amersham Biosciences, que permiten separar proteínas en diferentes rangos de masas moleculares. Ambas presentan un volumen total de 25 ml.

➤ *Superdex 75 HR 10/30*

Presenta un rango de exclusión de 3-70 kDa para proteínas globulares. Se calibró con azul dextrano (volumen muerto, $V_o = 7,3$ ml), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), quimotripsina (25 kDa), ribonucleasa (19 kDa) y aprotinina (6,5 kDa), obteniéndose la siguiente ecuación de calibración

$$\log MM = -0,1104 V_e + 2,701$$

donde V_e es el volumen de elución de la especie proteica que se desea caracterizar.

➤ *Superosa 6 HR 10/30*

Presenta un rango de exclusión de 5-5000 kDa para proteínas globulares. Se calibró con azul dextrano (volumen muerto, $V_o = 7,16$ ml), tiroglobulina (669 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), y ribonucleasa (19 kDa). Las masas moleculares de las fracciones obtenidas se calcularon usando la siguiente ecuación de calibración

$$\log MM = -0,2526 V_e + 5,976$$

donde V_e es el volumen de elución de la especie proteica incógnita.

Desarrollo

Para desarrollar las cromatografías se utilizó el equipo de FPLC Pharmacia LK. Todos los buffers de corrida empleados fueron filtrados a través de filtros de nylon de $0,22\mu\text{m}$ de poro antes de su uso. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

El solvente de corrida fue el buffer utilizado para solubilizar a la muestra. Inicialmente se equilibró la columna suministrando 50 ml del buffer correspondiente (equivalente a dos volúmenes de la misma) a una velocidad de flujo de 0,4 ml/minuto. Luego se procedió a inyectar la muestra y se eluyó a un flujo de 0,2 ml/minuto. Se colectaron las fracciones del eluato durante la totalidad de la corrida con un colector automático mientras se determinaron los valores de absorbancia a 280 nm de modo

continuo a la salida de la columna. Los perfiles obtenidos se procesaron con el programa OriginPro 8.

Muestras

Las muestras liofilizadas fueron dispersadas en sus respectivos buffers de corrida para obtener una concentración no superior a los 20 mg de proteína soluble/ml. Con ese objetivo se agitaron durante 1 hora a 25°C y 500rpm en un agitador térmico y luego se centrifugaron a 14000g a 20°C durante 20 minutos utilizando una microcentrífuga. El sobrenadante obtenido se filtró a través de filtros de nylon de 0,22 µm de poro y luego se inyectó en el equipo de FPLC, utilizando diferentes *loops* de acuerdo al volumen sembrado (200 o 500 µl).

3.2.4.2 Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

En este trabajo se utilizó la cromatografía HPLC de fase reversa. En esta metodología de separación las especies se separan por partición entre la fase estacionaria, de características apolares, y la fase móvil de carácter más polar que el relleno de la columna.

Reactivos

Solventes de corrida: Se utilizaron las siguientes mezclas acetonitrilo:agua (AcN:H₂O) filtradas a través de filtros de nylon de 0,22 µm de poro.

- Fase móvil A: AcN:H₂O 2:98, adicionada con 650 µl de ácido trifluoroacético (TFA) por litro de solución.
- Fase móvil B: AcN:H₂O 65:35, adicionada con 650 µl de TFA por litro de solución.

Equipo

Se utilizó el equipo de HPLC Waters que consta de un inyector, una bomba, un termostato, un colector automático y un detector con arreglo de diodos, que permite obtener los cromatogramas a diferentes longitudes de onda en forma simultánea.

Muestras

Las muestras líquidas se filtraron a través de filtros de nylon de 0,22 μm de poro y luego se inyectaron en el equipo de HPLC.

Columna

Se utilizó una columna analítica Sephasil Peptide C8, 12 μm ST 4.6/250 de Pharmacia Biotech.

Desarrollo

La columna se estabilizó pasando durante 20 minutos la fase móvil B a un flujo de 0,8 ml/minuto y luego, durante 40 minutos, la fase móvil A a 0,8 ml/minuto.

Se inyectaron 100 μl de muestra y las corridas se realizaron a 1,1 ml/minuto durante un tiempo total de 100 minutos. Las cromatografías se realizaron a 60°C. El gradiente de elución empleado parte desde un 100% de la fase móvil A hasta un 100% de la fase móvil B.

El volumen que eluyó de la columna fue recogido en tubos durante los primeros 60 minutos, recogiendo 1,1 ml en cada tubo.

3.2.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La estabilidad térmica y el grado de conformación nativa de las proteínas presentes en las muestras se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido. Se midió la cantidad de calor que absorbieron las diferentes dispersiones preparadas al someterse al programa de calentamiento establecido.

Para realizar los ensayos se utilizó un calorímetro diferencial de barrido DSC Q10 producido por TA instruments.

Muestras

Las muestras sólidas se dispersaron al 20% p/p en agua destilada. Antes de utilizarlas se dejaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en un recipiente cerrado para lograr la hidratación completa de los sólidos. Una vez pasado este tiempo se colocaron entre 12-16 mg de las suspensiones dentro de cápsulas de aluminio previamente pesadas, y se sellaron herméticamente antes de colocarlas en el calorímetro.

Desarrollo

El programa térmico utilizado incluyó una rampa de calentamiento desde 25 hasta 28°C a velocidad 2°C/minuto. A continuación se cambió la velocidad a 10°C/minuto, cubriendo el rango de temperaturas de 25 a 130°C. Se utilizó como referencia una cápsula vacía armada con doble tapa. Una vez finalizada la corrida, el peso seco de las muestras colocadas en las cápsulas se determinó perforándolas y secándolas en estufa a 105°C hasta peso constante.

Análisis

Las corridas calorimétricas se analizaron utilizando el programa TA Universal Analysis. A partir de los termogramas obtenidos se determinaron la temperatura (T_d , °C) y la entalpía de desnaturalización (ΔH , J/g). La T_d se obtuvo como la temperatura de máxima deflexión de la transición endotérmica, mientras que ΔH se calculó a partir del área correspondiente a dicha transición, que queda definida entre la línea de base y el pico.

3.2.6 Determinación de secuencias peptídicas

Algunas fracciones proteicas con actividad antitrombótica *in vitro* se enviaron a analizar al INRA, Unité BIA-Plateforme Biopolymères, Biologie Structurale, Nantes, Francia para conocer sus secuencias aminoacídicas.

Los péptidos presentes en las fracciones de interés fueron estudiados mediante MALDI-TOF y posteriormente se llevó a cabo un análisis de los mismos por nanocromatografía líquida con espectrometría de masas asociada (LC-MS/MS). La información obtenida se analizó utilizando el programa MASCOT 2.2 contra Uniprot restringida a taxonomía de *Amaranthus*.

3.3 Determinación de las propiedades anticoagulantes de las proteínas de amaranto

3.3.1 Determinación de la actividad antitrombótica *in vitro*

3.3.1.1 Método de las microplacas

En este trabajo de Tesis se utilizó el método de las microplacas, descrito por Yang y col. (2007) y Zhang y col. (2008). Este método estudia la vía común de la

coagulación en forma muy simplificada, ya que sólo se colocan en la mezcla de reacción el sustrato, fibrinógeno, y la enzima que lo proteoliza, trombina, provocando su polimerización. La aparición de turbidez se asocia a la formación del coágulo ocasionado por la polimerización de los monómeros de fibrina, los cuales son generados por acción de la trombina.

Reactivos

Buffer del ensayo: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, NaCl 0,12 mM.

Fibrinógeno bovino: se utilizó fibrinógeno bovino provisto por Sigma, se prepararon soluciones 0,1% p/v en el buffer del ensayo.

Trombina humana: a partir de trombina sólida de marca Sigma 330 UI se preparó una solución 12 UI/ml en el buffer del ensayo.

Heparina: Se utilizó heparina sódica provista por Abbott, 5000 UI/ml, en la que 1 mg heparina corresponde a 100 UI. Se prepararon diversas soluciones de heparina en el buffer del ensayo, cubriendo un rango entre 0,05 y 0,45 mg/ml.

Muestras

Las muestras de amaranto fueron dispersadas en el buffer del ensayo, se agitaron durante 1 hora a 25°C y 500rpm en un agitador térmico. Luego se centrifugaron a 14000g durante 20 minutos a 20°C utilizando una microcentrífuga.

Desarrollo

En este ensayo se establece una relación entre la turbidez detectada y la presencia de sustancias que alteren o inhiban la formación del coágulo en el sistema en estudio. De encontrarse inhibidores de la coagulación, la turbidez detectada será menor al control en el que sólo se colocarán el fibrinógeno y la trombina, o directamente no se desarrollará.

Para realizar el ensayo, todas las soluciones se preincubaron a 37°C. En cada pocillo de la microplaca se colocaron 140 µl de la solución de fibrinógeno y luego se adicionaron 40 µl de cada muestra, preparando un control positivo de inhibición de la coagulación utilizando heparina (inhibición total) y un control negativo utilizando el buffer (coagulación total). La microplaca se agitó convenientemente y se realizó la primera medida de absorbancia a 405 nm en un lector de placas. Esta lectura permite

obtener los valores de absorbancia que llamaremos blancos: muestra blanco y controles blanco. A cada pocillo se le adicionó posteriormente 10 µl de la solución de trombina para iniciar la reacción de coagulación. La microplaca se incubó nuevamente a 37°C durante 10 minutos y se realizó la medida de la absorbancia a 405 nm. Las lecturas de absorbancia obtenidas fueron las correspondientes a las muestras y a los controles. Todas las medidas se realizaron al menos por duplicado.

Cálculos

El grado de inhibición de la coagulación se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición} = [(C-CB) - (M-MB)] / (C-CB) \times 100$$

donde,

C: absorbancia del pocillo con el control negativo, sin inhibición de la coagulación, con trombina

CB: absorbancia del pocillo con el control blanco negativo, sin inhibidores de la coagulación, sin trombina

M: absorbancia del pocillo con la muestra, con trombina

MB: absorbancia del pocillo con la muestra, sin la trombina

En los casos en que se halló inhibición de la coagulación, se prepararon soluciones de esa muestra a diferentes concentraciones a fin de encontrar la relación entre el porcentaje de inhibición y la concentración de proteínas, obteniendo una dependencia del tipo dosis respuesta. Cuando fue posible se establecieron modelos matemáticos que ajustaran la dependencia encontrada y permitieran calcular la concentración proteica que provoca la mitad de la inhibición de la coagulación, IC_{50} , como parámetro que permite comparar la actividad biológica de distintas muestras.

3.3.1.2 Determinación de los cambios en los tiempos de coagulación a través de las pruebas globales de la hemostasia

Las pruebas globales de la hemostasia son ensayos de *screening* coagulométricos empleados comúnmente en la bioquímica clínica para localizar la causa de algún

desorden hemostático. En este trabajo se emplearon con el objetivo de estudiar el efecto de las proteínas y péptidos de amaranto sobre las distintas vías de la cascada de la coagulación (vía intrínseca, vía extrínseca y vía común). A diferencia del método de las microplacas en el que únicamente se enfrentan reactivos puros, en estos ensayos se trabaja con un sistema más complejo, como lo es el plasma, en el cual estarán presentes todos los factores séricos de la coagulación.

I. Tiempo de Trombina (TT)

En el sistema vascular completo, al producirse un trauma o injuria vascular, la trombina formada escinde al fibrinógeno soluble en monómeros de fibrina que polimerizan espontáneamente formando un coágulo que es luego estabilizado dando lugar a la malla insoluble de fibrina. El tiempo de trombina evalúa esta etapa de la coagulación que se conoce como *vía común*, y corresponde a la etapa final es decir, la conversión del fibrinógeno a fibrina. Por lo tanto, la anomalía en el nivel funcional del fibrinógeno, la presencia de sustancias que interfieran en la acción de la trombina sobre el fibrinógeno o que bloqueen la polimerización de los monómeros de fibrina, conducen a un prolongamiento del TT.

Para la bioquímica clínica el *tiempo de trombina* es el tiempo que tarda en coagular un plasma descalcificado, colocado a 37°C y presencia de una solución de trombina de actividad fija.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó un kit de Tiempo de trombina.

Reactivos

Plasma descalcificado: El plasma utilizado se obtuvo a partir de sangre humana. Se extrajo sangre humana con jeringa plástica, se la colocó en un tubo con citrato como anticoagulante en proporción 9:1, se centrifugó a 2500g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El plasma se obtuvo separando el sobrenadante antes de los 30 minutos y se reservó adecuadamente congelado hasta su uso.

Anticoagulante: solución de citrato trisódico dihidratado, 130 mM pH 7,2 de Wiener lab.

Trombina bovina liofilizada reconstituida con agua destilada, concentración 3,3 UI/ml de Wiener lab.

Heparina 0,1 mg/ml. Se utilizó heparina sódica provista por Abbott, 5000 UI/ml, en la que 1 mg heparina corresponde a 100 UI.

Buffer: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, NaCl 0,12 mM.

Equipo

El TT se determinó manualmente utilizando un baño termostático de acrílico transparente el cual permite visualizar el momento en el que se forma el coágulo (**Figura M.4**). El mismo baño se utilizó en las tres pruebas globales de la hemostasia que se ensayaron.



Figura M.4 Baño termostático de acrílico a la izquierda. Coágulo formado durante los ensayos de coagulación a la derecha.

Desarrollo

- *Control del plasma:* en tubos de hemólisis se agregaron 200 µl de plasma humano preparado como se mencionó antes, y se incubó a 37°C durante 2 minutos. Rápidamente se adicionaron 200 µl del reactivo de trombina y a partir de ese instante se registró el tiempo que tarda en formarse el coágulo mientras se levanta la solución con una punta que permite visualizar la presencia del coágulo. El tiempo se registró empleando un cronómetro.
- *Control positivo de inhibición de la coagulación con heparina:* en tubos de hemólisis se agregaron 150 µl de plasma humano junto con 50 µl de heparina y se incubaron a 37°C durante 2 minutos. Rápidamente se adicionaron 200 µl del reactivo de trombina y a partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo empleando un cronómetro.

- *Control negativo de inhibición de la coagulación con buffer:* en tubos de hemólisis se agregaron 150 µl de plasma humano junto con 50 µl de buffer Tris-HCl 0,05M, pH 7,2, NaCl 0,12 mM y se incubaron a 37°C durante 2 minutos. Rápidamente se adicionaron 200 µl del reactivo de trombina y a partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo empleando un cronómetro.
- *Ensayos de inhibición de la coagulación in vitro:* en tubos de hemólisis se agregaron 150 µl de plasma humano junto con 50 µl de las muestras proteicas de amaranto a diversas concentraciones y se incubaron a 37°C durante 2 minutos. Rápidamente se adicionaron 200 µl del reactivo de trombina y a partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo empleando un cronómetro.

Muestras

Las muestras de amaranto utilizadas fueron dispersadas en el buffer del ensayo, con agitación durante 1 hora a 25°C y 500rpm en un agitador térmico. Luego se centrifugaron a 14000g a 20°C durante 20 minutos utilizando una microcentrífuga.

II. Tiempo de Protrombina (TP)

Como ya se ha mencionado en la Introducción, el fenómeno de la coagulación puede desencadenarse por vía extrínseca, lo que implica una lesión tisular, o por vía intrínseca, cuando la sangre entra en contacto con epitelios distintos del vascular normal. El *tiempo de protrombina* es una prueba global para evaluar la vía extrínseca de la coagulación, siendo sensible a todos aquellos factores involucrados en la misma.

Se basa en la medida del tiempo que tarda en coagular un plasma descalcificado, colocado a 37°C y en presencia de un exceso de tromboplastina tisular y calcio.

La tromboplastina tisular, también denominada factor tisular, es una glicoproteína de membrana, presente en los fibroblastos de la pared de los vasos sanguíneos y en otras células. En condiciones fisiológicas, el factor tisular está ausente en las células endoteliales y por tanto no expuesto al contacto con la sangre. Sin embargo, cuando se produce la rotura de un vaso sanguíneo, por ejemplo a consecuencia de una herida, el factor tisular de los fibroblastos entra en contacto con la sangre y desencadena

la cascada de coagulación por la vía extrínseca. En éste proceso el trombo o coágulo primario, formado por la agregación de las plaquetas sanguíneas y el fibrinógeno plasmático, se convierte en un coágulo secundario.

Se utilizó un kit de Tiempo de Protrombina para la realización de esta prueba.

Reactivos

Plasma descalcificado: obtenido de igual manera que para el ensayo de TT.

Reactivo de Soluplastin: tromboplastina de cerebro de conejo, cloruro de calcio para una concentración final de 0,0125 M y cloruro de sodio para una concentración final de 0,1 M de Wiener lab.

Buffer: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2, NaCl 0,12 mM.

Desarrollo

- *Control del plasma:* se incubaron el plasma humano y 200 µl del reactivo soluplastin en tubos de hemólisis separados a 37°C en baño de agua durante 2 a 3 minutos. Luego se adicionaron 100 µl del plasma al tubo que contenía el reactivo. A partir de ese instante se registró el tiempo necesario para la formación del coágulo.
- *Control negativo de inhibición de la coagulación:* se incubaron 75 µl del plasma humano junto con 25 µl de buffer Tris-HCl 0,05M, pH 7,2, NaCl 0,12 mM y 200 µl de soluplastin en tubos de hemólisis separados en baño de agua a 37°C, durante 2 a 3 minutos. Luego se adicionaron los 100 µl del plasma+buffer al tubo conteniendo del reactivo soluplastin. A partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo.
- *Ensayos de inhibición de la coagulación:* se incubaron 75 µl del plasma humano junto con 25 µl de la muestra en estudio a diferentes concentraciones y 200 µl de soluplastin en tubos de hemólisis separados en baño de agua a 37°C, durante 2 a 3 minutos. Luego se adicionaron los 100 µl del plasma+muestra al tubo conteniendo del reactivo soluplastin. A partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo.

Muestras

Las muestras proteicas de amaranto se prepararon de la misma forma que la descrita para la determinación del TT.

III Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT)

Se basa en la medida del tiempo que tarda en coagular un plasma descalcificado, colocado en un baño a 37°C, en presencia de un exceso de cefalina, activador y calcio.

La cefalina, también denominada fosfatidiletanolamina, es un fosfolípido presente en las membranas celulares, uno de los más abundantes en los tejidos humanos. Su contacto con el plasma desencadena la activación de la vía intrínseca de la coagulación, de modo que el APTT permite detectar anormalidades en esta vía.

Así como en las otras pruebas, se utilizó un kit para determinar el tiempo de tromboplastina parcial activada.

Reactivos

Plasma descalcificado: obtenido de igual manera que para el ensayo de Tiempo de Trombina.

Reactivo de APTT: cefalina con tierra de diatomeas como activador particulado de Wiener lab.

Solución de CaCl₂: CaCl₂ 0,025 M de Wiener lab.

Buffer: Tris-HCl 0,05M, pH 7,2, NaCl 0,12mM.

Desarrollo

- *Control del plasma:* se incubaron separadamente en tubos de hemólisis la solución de CaCl₂ y 100 µl de plasma humano junto con 100 µl del reactivo APTT durante 3 minutos a 37°C. Luego se adicionaron 100 µl de la solución de CaCl₂ a la mezcla de reacción y a partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo.
- *Control negativo de inhibición de la coagulación con buffer:* del mismo modo que fue descrito para los ensayos del tiempo de trombina y de protrombina, este control se realizó reemplazando parte del plasma humano (25 µl) por el mismo volumen

de buffer Tris-HCl 0,05M, pH 7,2, NaCl 0,12mM. Esta mezcla se adicionó a 100 µl del reactivo APTT y se incubó el tubo durante 3 minutos a 37°C. Luego se adicionaron 100 µl de la solución de CaCl₂ termostatizada a la misma temperatura. A partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo.

- *Ensayos de inhibición de la coagulación:* los ensayos se realizaron de la forma descrita anteriormente, reemplazando 25 µl de plasma por 25 µl de solución de la muestra en estudio a diferentes concentraciones. La solución de plasma humano y muestra se adicionaron al reactivo APTT y se incubaron durante 3 minutos a 37 °C. Luego se adicionó el cloruro de calcio y se registró el tiempo hasta la formación del coágulo.

Muestras

Para preparar las muestras proteicas de amaranto se procedió de la misma manera que se describió para la determinación del TT.

3.3.1.3 Determinación de proteína soluble

El contenido de proteína soluble de las muestras se determinó usando el método colorimétrico de Lowry (Lowry y col., 1951). Si la determinación se realizó sobre muestras sólidas, las mismas se pesaron, se dispersaron en el solvente correspondiente, se agitaron durante 1 hora a 25°C y 500rpm en un agitador térmico y luego se centrifugaron a 14000g a 20°C durante 20 minutos. Si las muestras estaban previamente solubilizadas, se hicieron las diluciones adecuadas cuando fue necesario.

Para la realización de las curvas de calibración se utilizó albúmina de suero bovino (Sigma), que fue disuelta en el mismo buffer que la muestra. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

En aquellos casos en los que fue necesario determinar la solubilidad de las muestras estudiadas, se la calculó utilizando la siguiente expresión:

$$S\% = s \times 100 / \text{proteína total}$$

donde,

s: contenido de proteína en el sobrenadante determinado por Lowry

proteína total: contenido total de proteína determinado por Kjeldahl ($f = 5,85$)

3.3.2 Determinación de la actividad antitrombótica *in vivo* y *ex vivo*

Los estudios in vivo y ex vivo se realizaron con la colaboración del Profesor Dr. Gustavo Rinaldi (Centro de Investigaciones Cardiovasculares, FCM-UNLP).

Fueron llevados a cabo con animales en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

3.3.2.1 Formulación y elaboración de las dietas

Los animales utilizados en los ensayos fueron alimentados en forma controlada durante las experiencias. Para eso se prepararon dietas de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición, tomando como base la dieta AIN-93G (Reeves y col., 1993) en la Cátedra de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la UBA. Las dietas preparadas se denominaron C, para la dieta básica o control y A para aquella que incluyó el aislado proteico de *Amaranthus hypochondriacus*. En la **Tabla M.2** se presenta la formulación de las dietas.

En la dieta A se reemplazó parte de la fuente proteica de la dieta C, caseína, por el aislado de amaranto. El porcentaje de adición fue de 9 g aislado/100 g dieta, completando el aporte proteico con caseína de modo que ambas dietas resultasen isoproteicas. Ambas dietas se utilizaron en forma de polvo, y una vez preparadas se almacenaron en recipientes herméticamente cerrados a 4°C.

Ingredientes utilizados para la elaboración de la las dietas:

- *Caseína láctica* 85% de proteína (Dilsa).
- *Sales minerales:* calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, cloro, azufre inorgánico, hierro, zinc, manganeso, cobre, yodo, molibdeno, selenio, cromo, flúor, níquel, silicio, boro, litio y vanadio.
- *Mezcla vitamínica:* ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, biotina, vitamina B12, vitamina K, A, E y D.

- *L-Cistina* (Anedra) se suplementa a la dieta dado que la caseína es deficiente en aminoácidos azufrados.
- *Aceite de soja* (Molinos Río de La Plata).
- *Colina*: Cloruro de colina (Sigma).
- *Fibra*: Celulosa microcristalina (Sigma).
- *Dextrina* (Cofem).
- *Aislado proteico de Amaranthus hypochondriacus*: se realizaron sucesivas preparaciones según lo descripto en la sección 3.1.3 de Materiales y métodos. Todas las preparaciones fueron cuidadosamente mezcladas para determinar su composición centesimal y utilizarlas para la formulación de la dieta A.

Tabla M.1 Formulación de las dietas utilizadas en los ensayos *in vivo*.

INGREDIENTE	DIETA AMARANTO	DIETA CONTROL
<i>Caseína (g)</i>	64,7	140
<i>Sales minerales (g)</i>	35	35
<i>Mezcla vitamínica (g)</i>	10	10
<i>L-Cistina (g)</i>	1,8	1,8
<i>Aceite de soja (g)</i>	39,1	40
<i>Colina (ml)</i>	7,1	7,1
<i>Fibra</i>	50	50
<i>Dextrina (g)</i>	702,5	716,1
<i>Aislado proteico de amaranto (g)</i>	89,8	----

3.3.2.2 Diseño experimental del ensayo con animales

El ensayo se llevó a cabo utilizando 22 ratas Wistar macho (cepa WKAH/Hok) adquiridas en el ioterio del LAE de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales pesaron entre 300-400 g y tenían entre 11 y 12 semanas de edad al inicio del ensayo. Los animales se distribuyeron en 3 grupos, conformados por 7 u 8 ratas cada uno (**Figura M.5**), según se detalla a continuación:

- **Grupo Control (C):** formado por 7 ratas que fueron alimentadas con la dieta básica o control durante 2 semanas hasta su sacrificio.
- **Grupo Heparina (H):** este grupo fue alimentado también con la dieta control durante 2 semanas hasta su sacrificio. A diferencia de los animales del grupo anterior, los 7 integrantes de este grupo recibieron una inyección intraperitoneal de heparina de 250 UI, 30 minutos antes de la extracción de la sangre.
- **Grupo Amaranto (A):** las 8 ratas de este grupo se alimentaron con la dieta que contiene amaranto durante las 2 semanas previas a su sacrificio.

Cada grupo fue ubicado en 3 jaulas metálicas numeradas en forma creciente, colocando 2 o 3 ratas por jaula. Para identificar individualmente a los animales, se les realizaron marcas permanentes en las orejas de dos de ellas empleando un sacabocado. Los animales se identificaban con el número de la jaula y con las letras SM que significa *sin muesca*, MD para *muesca en oreja derecha* y MI para *muesca en oreja izquierda*. La distribución en grupos y jaulas se muestra en la **Figura M.5**. Durante el período de la experiencia se mantuvieron condiciones controladas de temperatura, humedad y luz (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad), y la cantidad de alimento y agua fueron proporcionados *ad libitum* (**Figura M.6**). Cada día se controló el peso del alimento consumido, mientras que cada animal fue pesado semanalmente.

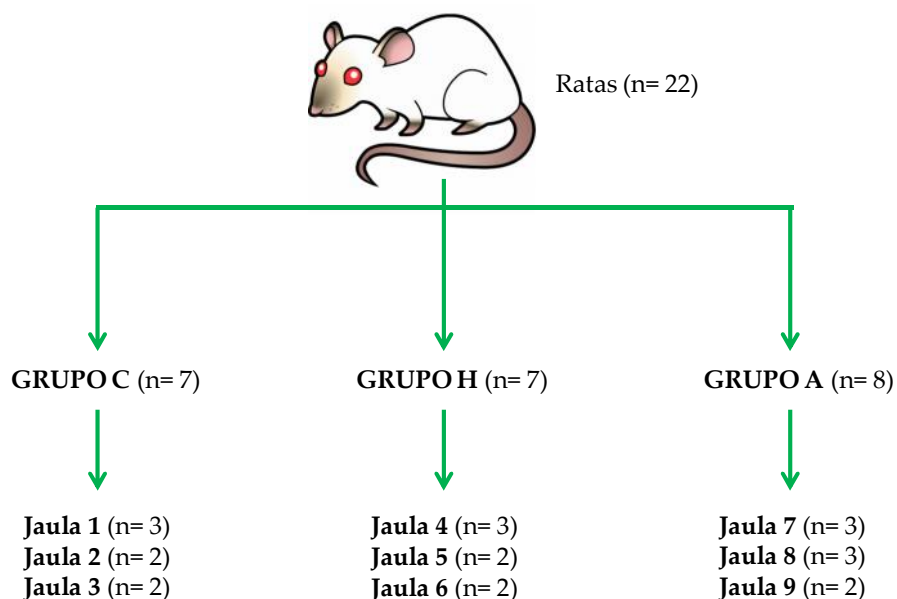


Figura M.5 Distribución de animales en los grupos y jaulas.



Figura M.6 Alimentación de los animales dentro de las jaulas.

Una vez que se cumplieron las dos semanas de alimentación con las dietas correspondientes, todos los animales pertenecientes al grupo en cuestión fueron anestesiados. Para eso cada rata se pesó y, de acuerdo a su peso, se anestesió con dos drogas que fueron aplicadas mediante inyecciones intraperitoneales de pentobarbital sódico, concentración 25 mg/ml (0,15 ml cada 100 g de peso de la rata) y diazepam, concentración 0,25 mg/ml (0,1 ml cada 100 g de peso de la rata).

Una vez que los animales estuvieron dormidos se inmovilizaron sobre una superficie rígida. A continuación se les colocó una cánula en la tráquea habiendo realizado previamente una incisión en la cara anterior del cuello con el objeto de tener una mejor visualización del procedimiento. Esta cánula permitió conectar a los animales a un ventilador para roedores en los casos en los que la rata presentó fallas en la respiración durante la operación, a fin de mantenerla con vida. En la primera foto de la **Figura M.7** se observa una imagen de este procedimiento. En este momento, es decir con el animal vivo y anestesiado, se realizó en ensayo del *Tiempo de sangría* que se describe a continuación.

Inmediatamente se realizó un corte en la zona abdominal, se localizó la aorta abdominal detrás del intestino y se la aisló con hilos para finalmente colocarle un *clamp* que permitió detener la circulación de la sangre. Una vez bloqueada la circulación se realizó una pequeña incisión en la arteria a través de la cual se introdujo una cánula (**Figura M.7**). La canulación de la aorta permite colectar la sangre del animal para realizar los ensayos *ex vivo* que se describirán a continuación.

Se colectó la totalidad de la sangre de cada rata. Una porción de la sangre extraída se empleó en el mismo momento de la extracción para determinar parámetros vinculados a la hemostasia, utilizando el método del hemostatómetro que describiremos a continuación (Materiales y métodos 3.3.2.3.2). El resto se recogió en tubos cónicos con tapa para obtener el plasma y realizar sobre el mismo los ensayos de coagulación conocidos como pruebas globales de la hemostasia, tal como se describió en Materiales y métodos 3.3.1.2.

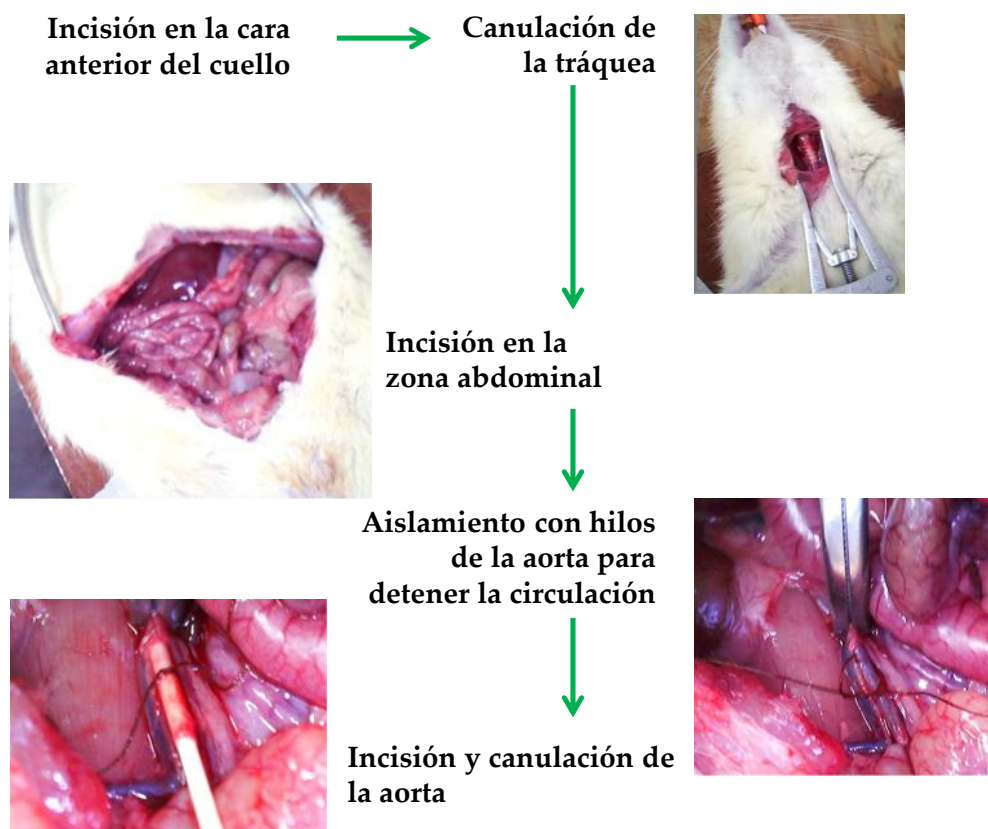


Figura M.7 Procedimiento quirúrgico empleado para los ensayos *in vivo* y *ex vivo*.

3.3.2.3 Ensayos realizados

3.3.2.3.1 Ensayo *in vivo*: Tiempo de Sangría

El tiempo de sangría mide la fase primaria de la hemostasia: la interacción de las plaquetas con la pared del vaso sanguíneo y la formación del tapón plaquetario. Este parámetro permite detectar alteraciones de la función plaquetaria y es uno de los principales estudios en los trastornos de la coagulación (Quick, 1968).

Para llevar a cabo las medidas se siguió el protocolo de Stengberg y col. (1998). Brevemente, se hizo un pequeño corte en la punta de la cola del animal mientras se encontraba bajo el efecto de la anestesia. Una vez efectuada la herida se registró el sangrado tocando la zona de la incisión con un trozo de papel de filtro cada 30 segundos. Mientras hay sangrado, se observa una marca roja en el papel. El *tiempo de sangría* se tomó como el tiempo necesario para que cese completamente el sangrado y no deje marca alguna en el papel de filtro.

3.3.2.3.2 Ensayos *ex vivo*

I. Hemostatómetro

Para estudiar diversos parámetros de la coagulación mientras la sangre fluye, se empleó un equipo denominado hemostatómetro. Este equipo fue descrito y puesto a punto por Görög y Ahmed (1984), mejorado por Görög y Kovacs (1991) y patentado finalmente en el año 1994 por ellos mismos. Basándose en su descripción y para realizar las determinaciones que se presentan en este trabajo, el Dr. Gustavo Rinaldi construyó un hemostatómetro en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. En la **Figura M.8** se presenta un esquema del equipo, tal como aparece en los trabajos mencionados, mostrando los diámetros de los tubos y agujas realmente utilizados.

Como mencionamos antes, en este ensayo se desencadena la coagulación mientras la sangre está fluyendo. Para generar el flujo, el equipo posee además de las partes que se observan en la **Figura M.8**, una bomba Harvard capaz de impulsar la sangre a un flujo constante (**Figura M.9, 1**). En nuestro caso el flujo generado por la bomba fue 0,2 ml/min

y se utilizó para impulsar parafina líquida desde una jeringa plástica hacia la cámara de acrílico que contenía la sangre de la rata. Dicha cámara se encontraba termostatzada a 37°C mediante un baño de agua. A medida que la parafina es introducida en la cámara, la sangre es desplazada e impulsada a fluir a través de un tubo de polietileno de 1,6 mm de diámetro interno. El equipo está conectado a un transductor de presión que detecta la

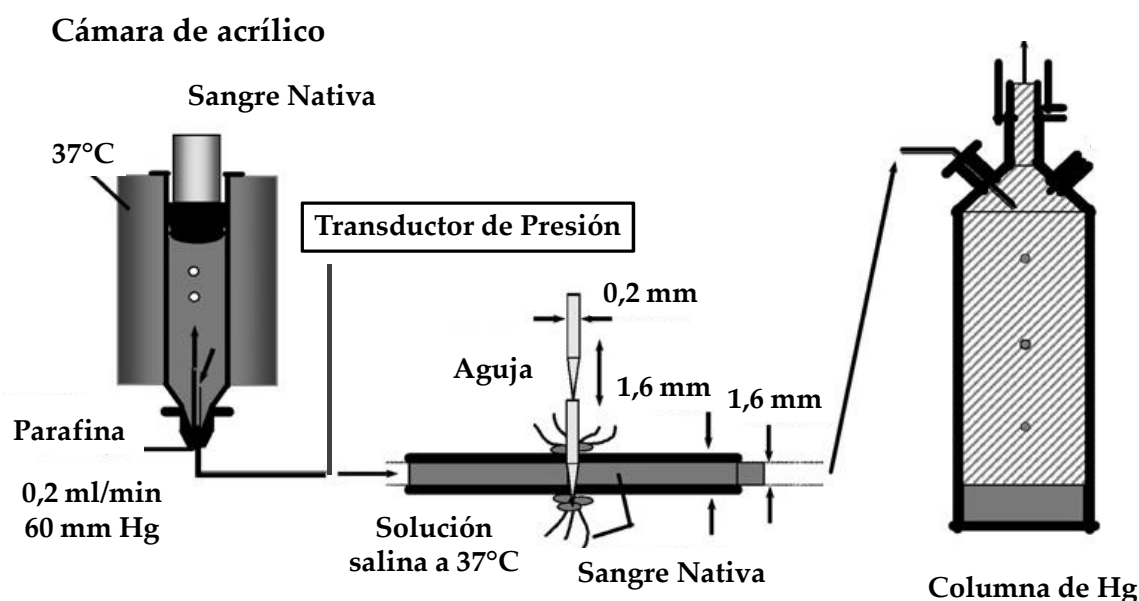


Figura M.8 Esquema del hemostatómetro.

presión en el sistema, marca Argon Medical Devices (**Figura M.9, 5**), y a un analizador que registra los valores detectados. El analizador está constituido por un amplificador y una plaqueta analógico-digital con software DT Measure Foundry, que puede tomar 100 medidas por segundo (**Figura M.9, 3**). Estas dos partes del equipo nos permiten registrar la variación de la presión dentro del sistema en función del tiempo. Finalmente el tubo por el que fluye la sangre desemboca en un recipiente de lavado que contiene agua y que a su vez, está conectado a otro tubo que posee mercurio en su interior y permite fijar la presión del sistema. Al inicio del ensayo la presión se fijó en 60 mm de Hg, regulando la profundidad de la inmersión del extremo del tubo en el mercurio. Esta operación se controló utilizando un tornillo micro, similar al que poseen los microscopios (**Figura M.9, 6**). Para iniciar el ensayo y a un tiempo fijo contado desde la extracción de la sangre, el tubo por el que fluye la sangre se perfora para permitir la salida del fluido. En ese momento la presión en el sistema cae abruptamente y comienzan los fenómenos

tendientes a ocluir la perforación del tubo por coagulación de la sangre. La porción del tubo donde se efectuó el pinchazo con la aguja se ubicó en otra cámara termostatzada que contiene una solución salina a 37°C en contacto con el tubo para que, una vez efectuada la “injuria”, la sangre fluya hacia la misma (Figura M.9, 4).

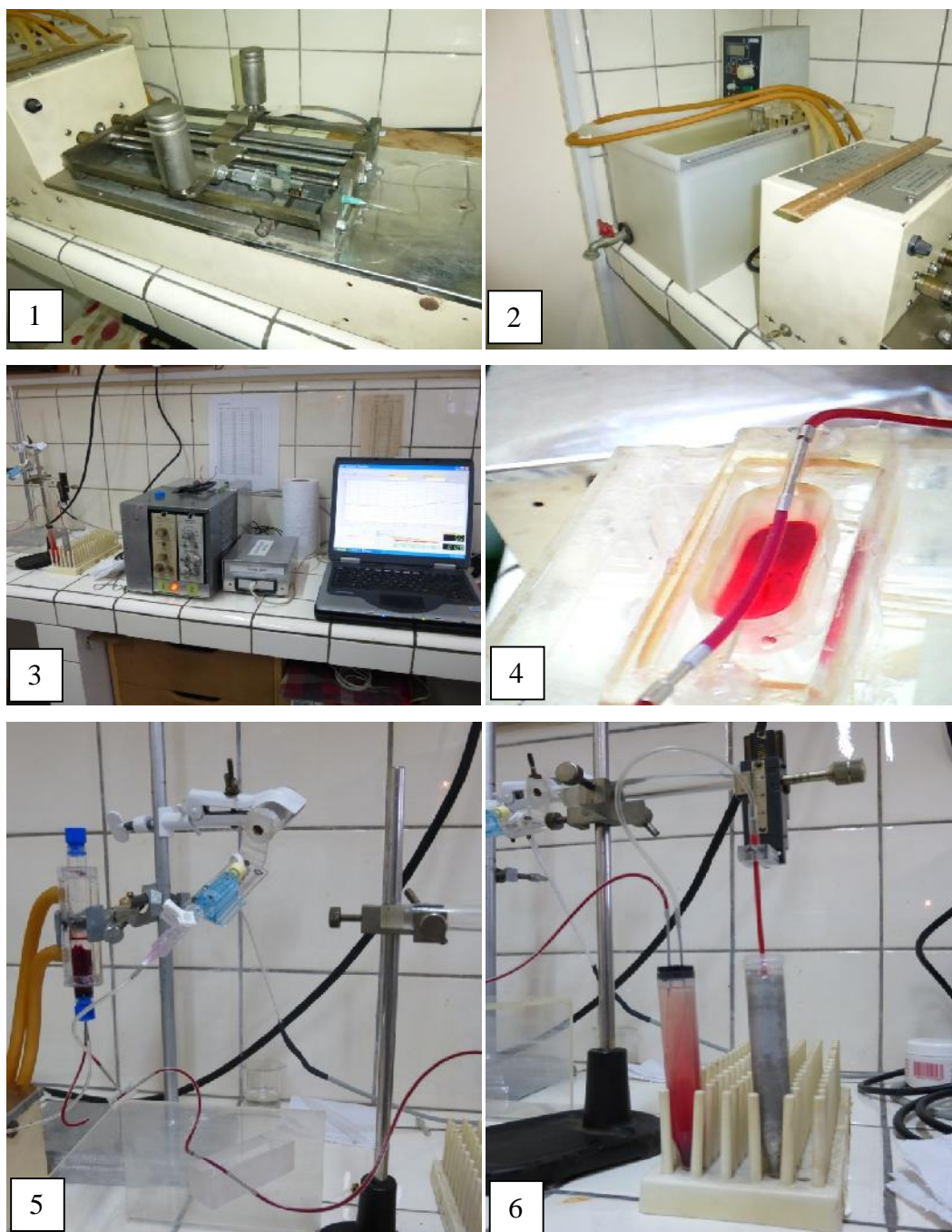


Figura M.9 Imágenes del hemostatómetro. 1 Bomba Harvard. 2 Baño termostático. 3 Analizador y registrador de la presión. 4 Tubo perforado, conexiones y cámara con solución salina termostatzada. 5 Cámara termostatzada con sangre en su interior y transductor de presión. 6 Tubo de lavado y tubo de mercurio con tornillo micro.

El diseño del equipo incluyó conexiones que permitieron cambiar la zona perforada del tubo por otra intacta en cada determinación. Estas conexiones se observan claramente en la **Figura M.9, 4**.

El hemostatómetro es un equipo que permite simular la hemostasia. Una vez finalizado el período de alimentación controlada de las ratas (Grupos C, H y A) se procedió a anestesiarse a los animales y se les extrajo la sangre como se mencionó en Materiales y métodos 3.3.2.2. La sangre extraída se colocó en la cámara del hemostatómetro, se activó la bomba y a los 90 segundos exactos de la extracción se perforó el tubo de polietileno con el objeto de simular la injuria a la que se podrían enfrentar los vasos sanguíneos. Se monitoreó la variación de la presión en función del tiempo y se estudió el proceso de la coagulación mediante la determinación de parámetros asociados a la formación del tapón plaquetario y la coagulación de la sangre, fenómenos que se desencadenaron una vez efectuada la perforación del tubo.

El monitoreo constante de la presión nos permitió obtener diagramas semejantes al presentado en la **Figura M.10**, llamados hemostatogramas.

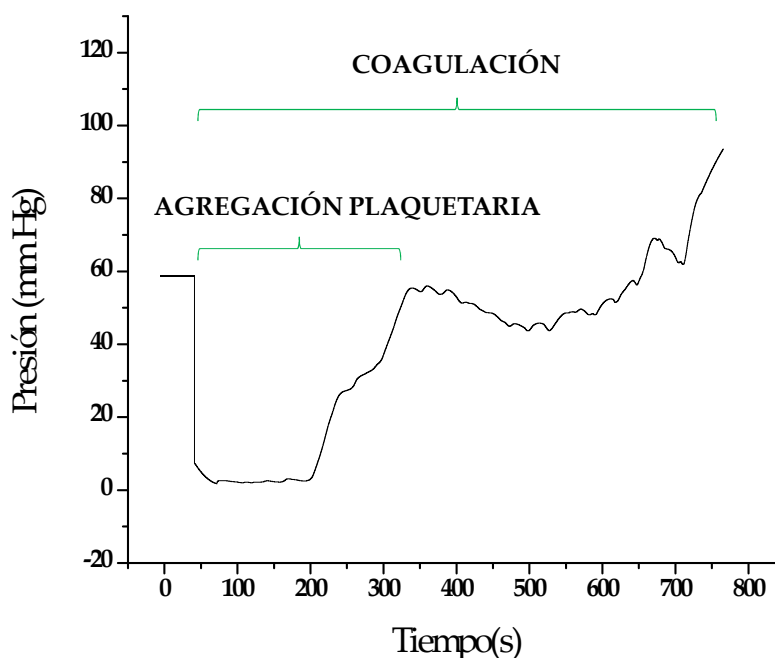


Figura M.10 Hemostatograma y tiempos asociados a la agregación plaquetaria y a la coagulación total.

La caída inicial de la presión en el hemostatograma se debe a la perforación efectuada y a la consiguiente “hemorragia” asociada. La recuperación de la presión hasta la presión que el sistema tenía inicialmente se asoció a la formación del tapón plaquetario. Además se consideró coagulación total al momento en que la presión alcanza los 100 mm Hg, momento en el cual la sangre deja de fluir a través de la perforación realizada en el tubo. Se obtuvieron dos tiempos de cada hemostatograma, el de formación del tapón plaquetario y el de coagulación total. También se midieron las áreas correspondientes al proceso de agregación plaquetaria con el objeto de analizar comparativamente las pendientes de formación del tapón plaquetario.

II. Pruebas globales de la hemostasia

Los ensayos de la coagulación tiempos de trombina, de protrombina y de tromboplastina parcial activada, TT, TP y APTT respectivamente, se realizaron con el plasma de los animales de los grupos C, H y A, obtenido a partir de la sangre de las ratas. Para obtener el plasma se procedió de modo similar a lo descrito en la sección Materiales y métodos 3.3.1.2. A la sangre de las ratas se la colocó en un tubo con citrato como anticoagulante en proporción 9:1, se centrifugó a 2500g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El plasma se obtuvo separando el sobrenadante antes de los 30 minutos y se reservó adecuadamente congelado hasta su uso.

El ensayo del TT se realizó colocando 200 μ l de plasma, los cuales se incubaron a 37°C durante 2 minutos. Rápidamente se adicionaron 200 μ l del reactivo de trombina y a partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo empleando un cronómetro.

Para el TP se incubaron el plasma obtenido a partir de la sangre de rata y 200 μ l del reactivo soluplastin en tubos de hemólisis separados a 37°C en baño de agua durante 2 a 3 minutos. Luego se adicionaron 100 μ l del plasma al tubo que contenía el reactivo. A partir de ese instante se registró el tiempo necesario para la formación del coágulo.

Para determinar el APTT se incubaron separadamente en tubos de hemólisis la solución de CaCl_2 y 100 μ l de plasma obtenido a partir de sangre de rata junto con 100 μ l

del reactivo APTT, durante 2 a 3 minutos a 37°C. Luego se adicionaron 100 µl de la solución de CaCl₂ a la mezcla de reacción y a partir de ese instante se registró el tiempo de formación del coágulo.

Los tiempos de trombina, protrombina y tromboplastina parcial activada determinados en el grupo de animales que recibió la dieta sin amaranto y que no fue heparinizado antes del sacrificio, Grupo C, fueron tomados como tiempos normales.

3.3.3 Pruebas de absorción de fracciones con actividad antitrombótica a través del epitelio intestinal. Ensayos *in vitro* en cultivos celulares

La biodisponibilidad de los péptidos que presentan actividad biológica depende de su absorción. Con el fin de analizar el comportamiento de las especies proteicas activas en la luz intestinal y su pasaje a través del epitelio se usaron modelos que buscan predecir cómo sería la absorción *in vivo* de los mismos.

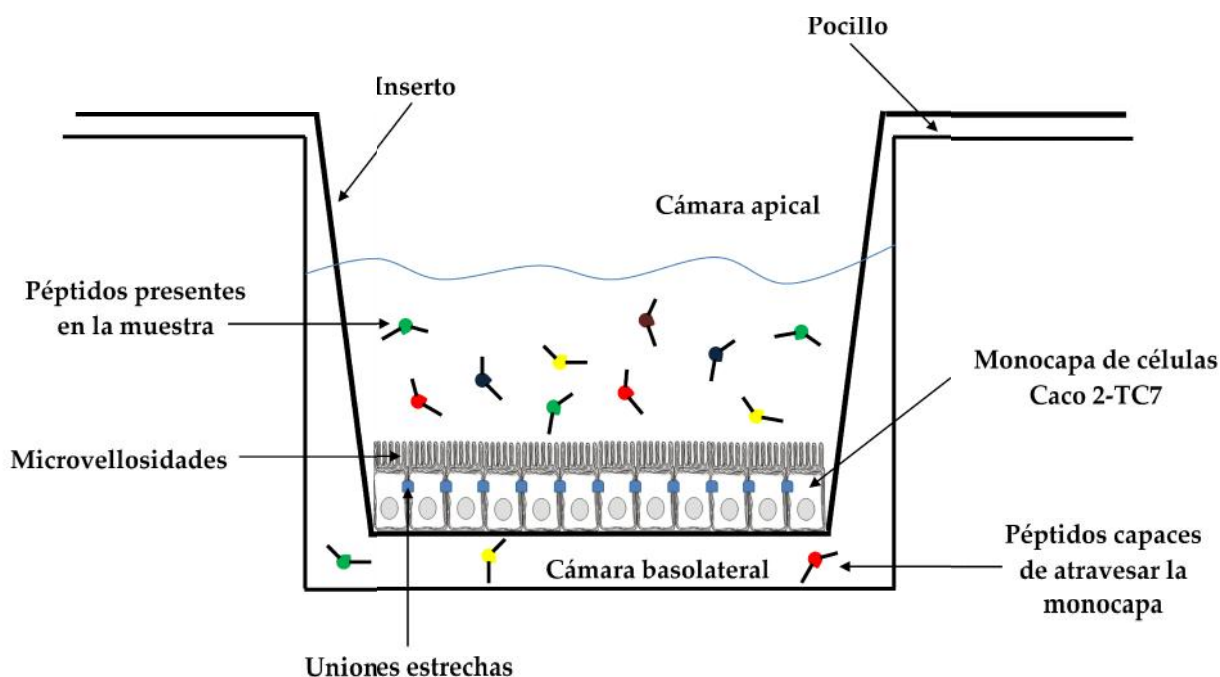


Figura M.11 Diagrama del montaje utilizado para las mediciones de la actividad transportadora de la monocapa de células Caco 2-TC7.

Se planificaron ensayos en los cuales se enfrentó una solución de las muestras a una monocapa de células de epitelio intestinal, células Caco 2-TC7. Los experimentos utilizados incluyen la formación de una monocapa de células sobre filtros

semipermeables, denominados insertos (**Figura M.11**), de modo de establecer una disposición similar a la que existe *in vivo* en la mucosa intestinal (Yamashita y col., 1997; Artursson, 1991). En el esquema experimental se generan compartimentos separados por la monocapa celular, a los que se les puede estudiar su contenido. Los compartimentos llamados cámara apical y cámara basolateral podrían asociarse a las instancias previa y posterior a la absorción a través del epitelio intestinal.

3.3.3.1 Células utilizadas

Las células Caco 2-TC7 son células epiteliales de carcinoma de colon que conservan muchas características del epitelio normal. Fueron empleadas en la formación de la monocapa celular y correspondieron a los pasajes N° 22-23 del cultivo inicialmente adquirido en la ATCC. Este clon fue aislado a partir de pasajes tardíos de células Caco 2 y constituye un modelo completamente validado para el estudio de absorción (Caro y col., 1995).

3.3.3.2 Medio de cultivo celular

Se utilizó el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Este medio de cultivo posee alta concentración de glucosa (4,5 g/l), suero fetal bovino al 10% p/v (inactivado a 65°C) y antibióticos Penicilina/Estreptomicina (1000 UI Penicilina + 1000 µg Estreptomicina/ml). El pH se ajustó a 7,4. El medio se esterilizó por filtración con membrana con tamaño de poro de 0,22 µm y se guardó a 4°C.

3.3.3.3 Cultivos celulares

La expansión de la población celular se realizó utilizando las técnicas descriptas por Yamashita y col. (2000 y 2002). Las células Caco 2-TC7 fueron sembradas a una densidad de 3×10^4 /ml medio en botellas de plástico de cultivo celular de 25 cm² e incubadas a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Para

mantener el cultivo en condiciones adecuadas se procedió a cambiar el medio cada dos días hasta que las células alcanzaron la confluencia celular.

3.3.3.4 *Monocapas celulares*

Para obtener monocapas celulares confluentes, las células Caco 2-TC7 provenientes de cultivos confluentes realizados en las botellas de plástico de cultivo celular se sembraron en insertos de policarbonato. Los insertos marca Falcon poseen 0,65 mm de diámetro y presentan una superficie porosa de 0,4 μm de diámetro de poro. Para sembrarlos los cultivos confluentes fueron digeridos con una solución de tripsina 0,075% p/v y ácido etilendiaminotetracético, EDTA 0,025% p/v. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 1000rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido fue lavado con PBS (solución de buffer KH_2PO_4 0,144 g/L, NaCl 9 g/L, Na_2HPO_4 0,795 g/L, pH 7,3) y resuspendido en medio de cultivo fresco. Una alícuota de esta suspensión se tiñó con azul tripán, el cual tiñe únicamente células muertas y sirve para determinar el número de células viables empleando la cámara de Neubauer. Una vez determinado el número de células viables se sembraron en los insertos de policarbonato alrededor de 1×10^5 células/cm², con el fin de establecer la densidad de siembra requerida para obtener una monocapa celular uniforme en el menor tiempo. Cada dos días se cambió el medio de cultivo y se registró el valor de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).

La TEER es generada por las capas de epitelio celular. Sus unidades son ohms.cm². El valor de TEER se utilizó para evaluar la confluencia e integridad de la monocapa formada en los insertos. Estas mediciones se realizaron empleando un voltímetro con electrodos (sistema Millicell ERS, Millipore) que mide la resistencia transmembrana.

3.3.3.5 *Determinación de la actividad transportadora*

Para determinar la actividad transportadora de la monocapa, se utilizaron cultivos celulares que, ubicados en los insertos presentaran valores de TEER entre 450 y

550 ohms.cm². La actividad transportadora de la monocapa celular fue determinada en dirección apical-basolateral, siguiendo el procedimiento descrito por Yamashita y col. (2000 y 2002), que responde a la geometría mostrada en la **Figura M.11**.

Los insertos ya sembrados con células Caco 2-TC7, se colocaron en placas de acrílico de 24 pocillos. Allí se adicionaron 0,5 ml de PBS en las cámaras apical y basolateral y los insertos se incubaron durante 20 minutos a 37°C en atmósfera conteniendo 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Transcurrido el tiempo de la incubación, se retiró el PBS de las cámaras y se colocó En la cámara apical del inserto se colocó entonces 0,2 ml de las soluciones de las muestras en estudio, mientras que en la cámara basolateral se colocaron 0,65 ml de PBS.

Luego, las placas conteniendo los insertos con la muestra en estudio se incubaron durante 3 horas en las condiciones anteriormente descritas, que es el tiempo estimado en que estarían en contacto con el intestino en nuestro organismo. Una vez concluido el ensayo se tomó la totalidad de los volúmenes presentes en las cámaras apical y basolateral para posteriormente analizarlas mediante RP-HPLC (Materiales y métodos 3.2.4.2). Una vez analizados los cromatogramas se seleccionaron las fracciones colectadas que resultaron de interés y a dichas fracciones se les determinó la actividad antitrombótica por el método de las microplacas (Materiales y métodos, 3.3.1.1).

Las muestras utilizadas en este estudio correspondieron a fracciones parcialmente purificadas de proteínas de amaranto que mostraban actividad antitrombótica *in vitro*.

3.3.3.6 Ensayo de citotoxicidad

Para realizar el efecto de las muestras sobre las células y descartar posibles efectos citotóxicos de las proteínas de amaranto se realizaron estudios empleando el ensayo del metil tetrazolium (MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide) (Di Virgilio y col., 2010).

Brevemente, se sembraron un total de 2,5x10⁴ células Caco 2-TC7/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante una semana a 37 °C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa, permitiendo que se adhieran a la superficie. Pasado el tiempo

mencionado se adicionaron distintas concentraciones de las muestras en estudio y se incubaron durante 4 horas en las condiciones anteriormente descriptas. Luego se reemplazó el medio por uno adicionado con 0,5 mg/ml de MTT y se volvió a incubar la placa durante 3 horas en las mismas condiciones. Posteriormente, la placa se lavó con PBS y luego se trató con 100 µl de dimetilsulfóxido/pocillo (DMSO) para lisar las células. La acción del DMSO permitió liberar un producto coloreado formado a expensas del MTT que había sido captado por las mitocondrias de las células. Para cuantificar el colorante liberado se midió la intensidad de color determinando la absorbancia a 570 nm. Los valores de absorbancia se corrigieron restándoles el valor de absorbancia del blanco preparado con células incubadas con las muestras a estudiar, pero a las que no se le había adicionado el MTT.

La viabilidad celular (Vc) se demuestra en este ensayo por la conversión de la sal de tetrazolium MTT a formazan, que es el compuesto coloreado, a través de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales. Es por esta razón que sólo se observará coloración si las células conservan actividad metabólica. La viabilidad celular frente a las muestras proteicas se calculó como porcentaje del control positivo de viabilidad, asumiendo que las células a las que no se les adicionó ninguna muestra conservan el 100% de viabilidad, mediante la siguiente expresión:

$$\text{Vc por actividad mitocondrial} = \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ muestra} / \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control (+)} \times 100$$

3.4 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente empleando el programa GraphPad Prism 5. Se efectuó el análisis de varianza (ANOVA), y para la comparación de medias se utilizaron el Test de la menor diferencia significativa (LSD) descripta por Fisher (1945) y el Test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey (Tukey, 1949), ambos con un nivel de significación de $\alpha = 0,05$ (95% de confianza).

El cálculo de las concentraciones que inhiben la formación de los coágulos en un 50%, IC₅₀, de las muestras activas fue realizado utilizando la aplicación de ajuste a curvas

sigmoideas del GraphPad Prism 5. Esta aplicación está especialmente diseñada para analizar curvas de tipo dosis-respuesta y calcular IC_{50} aproximando los datos a curvas ajustadas a diversos modelos matemáticos.

The background features three large green circles, each surrounded by a light gray shadow. Two thin green lines intersect diagonally across the page. The text is centered in the middle-left area.

RESULTADOS I

PROTOCOLOS DE HIDRÓLISIS

4 RESULTADOS I

Hidrolizados proteicos de amaranto: Estudio de diversos protocolos y productos de hidrólisis

En este capítulo presentaremos el estudio de diversos protocolos de hidrólisis que realizamos sobre aislados proteicos de amaranto con el objetivo de obtener distintos polipéptidos y péptidos activos. Se estudió la acción de varias enzimas proteolíticas. Los hidrolizados obtenidos a partir de ellas así como los aislados de partida fueron caracterizados fisicoquímicamente. Por último, se les determinó la actividad antitrombótica in vitro.

4.1 Preparación de hidrolizados proteicos de amaranto por acción de una proteasa endógena

Algunos estudios previamente realizados en nuestro laboratorio mostraron la presencia de una proteasa endógena en los aislados proteicos de amaranto activa a pH ácido (Ventureira y col., 2012). El hallazgo fue casual, y se puso de manifiesto al estudiar las propiedades funcionales de superficie de las proteínas de amaranto en condiciones ácidas. Se demostró en esa oportunidad (Ventureira, 2010) que la enzima no es activa en presencia de pepstatina A, inhibidor de proteasas aspárticas y que, si la dispersión del aislado se somete a tratamiento térmico, 100°C durante 10 minutos, antes de acidificarla, se observa el mismo perfil electroforético que el que presenta el aislado a pH neutro o alcalino, en los que la proteasa está inactiva, ya que como es conocido las proteasas aspárticas son activas a pH ácido (Rao y col., 1998).

Resultó atractiva la idea de preparar hidrolizados de amaranto por acidificación de la dispersión y activación de la proteasa endógena como único tratamiento, ya que un proceso sencillo y de bajo costo podría generar hidrolizados de amaranto con potenciales componentes bioactivos. Este trabajo que se inició durante el desarrollo de la Tesina de grado de la Licenciada Sabrina Ibáñez, fue ampliado y completado en este trabajo de Tesis.

4.1.1 Estudios asociados a la actividad de la proteasa endógena

4.1.1.1 Presencia de la proteasa endógena en diferentes especies de amaranto

Las proteínas de almacenamiento provenientes de diferentes especies de amaranto se encuentran ampliamente estudiadas. Entre las caracterizaciones más empleadas para estudiar comparativamente a las semillas de diferentes especies de amaranto se destacan el contenido proteico total, los perfiles electroforéticos y la composición aminoacídica. Aunque se han descripto grandes similitudes entre las proteínas de las distintas variedades de amaranto estudiadas (*A. tricolor*, *A. mantegazzianus*, *A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus*, *A. paniculatus*), existen algunas pequeñas diferencias entre ellas (Gorinstein y col., 1991; Drzewiecki, 2001; Eloho y col., 2013).

La proteasa aspártica descripta por Ventureira y col. (2012) fue hallada en aislados proteicos preparados con semillas de *Amaranthus hypochondriacus*. La presencia de proteasas en las semillas es un hecho común, ya que se encuentran involucradas en muchos aspectos de la fisiología y el desarrollo de la planta. Estas enzimas son las que hidrolizan y movilizan a las proteínas de reserva para que puedan ser utilizadas como fuente de nitrógeno por las semillas en el momento de la germinación (Huffaker, 1990; Schaller, 2004). Esta proteasa, acompaña a las proteínas aisladas a partir de la harina, solubilizándose y precipitando con ellas. Como en este trabajo se usaron tanto semillas de *A. hypochondriacus* como de *A. mantegazzianus* para preparar los aislados, decidimos verificar no sólo que la proteasa aspártica estuviera presente sino que mantuviera la actividad en los aislados preparados con *A. mantegazzianus*.

Aislados proteicos de *A. mantegazzianus* y de *A. hypochondriacus* se dispersaron en medio ácido, buffer H_3PO_4 20 mM, pH 3 durante 100 minutos, con agitación a temperatura ambiente. Durante este tratamiento, de acuerdo a los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, se activaría la proteasa endógena, la cual hidrolizaría a las proteínas del aislado. Como controles se solubilizaron las mismas muestras en un buffer levemente alcalino (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,12 mM, pH 7,2), en iguales condiciones de agitación, tiempo y temperatura. También se prepararon

muestras de ambas especies directamente en el buffer de muestra utilizado en la electroforesis Tricina SDS-PAGE (Materiales y métodos 3.2.3). La **Figura RI.1** muestra los perfiles electroforéticos obtenidos.

Los perfiles electroforéticos de los aislados proteicos de *A. mantegazzianus* y de *A. hypochondriacus* son muy similares, prácticamente idénticos. Sólo se detectan diferencias en la intensidad de algunas bandas de baja masa molecular, igual o inferior a 14,4 kDa. Estas calles además presentan los mismos polipéptidos que las muestras solubilizadas a pH 7,2 aunque con diferente intensidad, siendo más intensas las bandas correspondientes a aquellas calles donde se encuentran sembrados los sólidos disueltos en el buffer de muestra.

El aislado de amaranto presenta numerosas bandas características de sus polipéptidos constitutivos: agregados de alta masa molecular, polipéptidos de aproximadamente 52-56 kDa (tomando la zona más intensa de la banda 56 ± 1 kDa), y los polipéptidos ácidos y básicos de aproximadamente 30 y 20 kDa (36 ± 1 kDa y 31 ± 1 ; $26,2 \pm 0,8$ y 19 ± 1 kDa respectivamente), A y B, que se encuentran unidos por puentes disulfuro en las globulinas tipo 11S y P (Martínez y Añón, 1996). Se conoce que son varios polipéptidos ácidos y básicos los que se encuentran ensamblados en las globulinas mencionadas. Además se observan algunas bandas de 67 ± 1 kDa y otras de baja masa molecular que corresponden a polipéptidos de la globulina 7S, presente en menor cantidad en el amaranto, pero que se halla en los aislados, tal como describieron Quiroga y col. (2010). Se pueden apreciar bandas menos intensas de masas moleculares inferiores a 26 kDa, que corresponderían a polipéptidos de globulinas y/o glutelinas. Los perfiles electroforéticos obtenidos con los aislados proteicos de amaranto se corresponden con aquellos previamente descritos por otros autores (Konishi y col., 1991; Gorinstein y col., 1991 y 1998; Barba de la Rosa y col., 1992a; Segura-Nieto y col., 1994; Martínez y col., 1997; Quiroga y col., 2007).

Analizando comparativamente los perfiles de los aislados solubilizados a pH 7,2 y los solubilizados a pH 3 se observa, en ambas especies de amaranto, un cambio drástico. Desaparecen muchas bandas de alto peso molecular y otras disminuyen en intensidad,

manteniéndose sólo de manera nítida algunas bandas de masa molecular inferior a 17 kDa y la banda de 36 ± 1 kDa. Estos resultados son coincidentes con aquellos descritos por Ventureira (2010), quien pudo observar una importante disminución en la intensidad de las bandas y la desaparición de bandas de alta masa molecular de la muestra tratada a pH 2 respecto a sus controles.

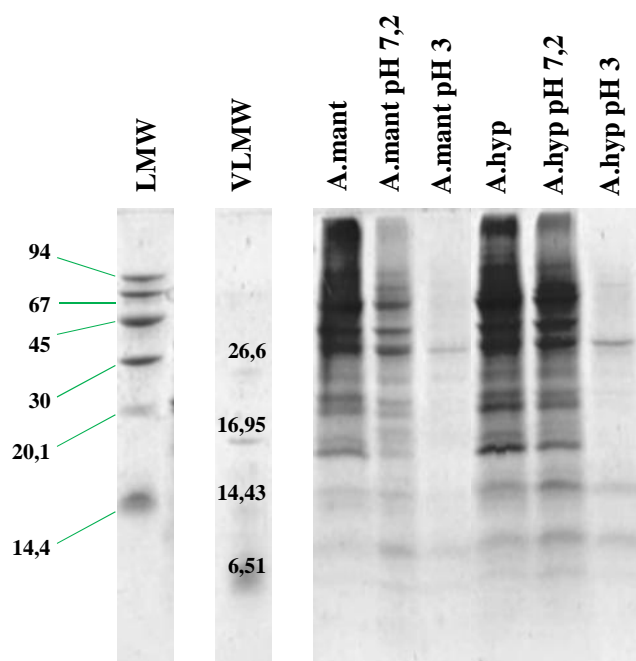


Figura RI.1 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE en ausencia de 2-ME. Aislado proteico de *Amaranthus mantegazzianus* (**A.mant**), solubilizado a pH 7,2 (**A.mant pH 7,2**) y solubilizado a pH 3 (**A.mant pH 3**); y aislado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* (**A.hyp**), solubilizado a pH 7,2 (**A.hyp pH 7,2**) y solubilizado a pH 3 (**A.hyp pH 3**). Patrones de muy bajo peso molecular, (VLMW); patrones de bajo peso molecular, (LMW).

Los resultados obtenidos coinciden con lo descrito por Ventureira y col. (2012), sugiriendo que hay un efecto proteolítico de la proteasa endógena sobre las muestras y que se encuentra presente en ambas especies de amaranto y presenta actividad a pH 3.

4.1.1.2 Actividad de la proteasa endógena en aislados proteicos de amaranto obtenidos en diferentes años

Para determinar si el tiempo de almacenamiento de los aislados produce efectos sobre la actividad de la proteasa, se analizaron electroforéticamente tres aislados proteicos de *A. mantegazzianus* obtenidos en los años 2010, 2011 y 2012. En la **Figura RI.2** se presenta un gel de Tricina SDS-PAGE en condiciones no reductoras donde se

sembraron los distintos aislados proteicos solubilizados con agitación durante 100 minutos en buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,12 mM, pH 7,2 y en buffer H₃PO₄ 20 mM, pH 3.

En la **Figura RI.2** se observa que los perfiles electroforéticos no cambian con el tiempo de almacenamiento de los aislados proteicos, lo que indica que la proteasa endógena mantuvo su actividad a pH 3 en los tres casos. Tal como se describió anteriormente, se observa una disminución de la intensidad o la desaparición de bandas de alto PM en la zona superior del gel. Las bandas de PM inferiores a 7 kDa se mantienen sin modificación y muestran ser resistentes a la hidrólisis realizada en estas condiciones. También se conservan algunas bandas de alto peso molecular, aunque no con la misma intensidad, tal como se pudo apreciar en la **Figura RI.1**.

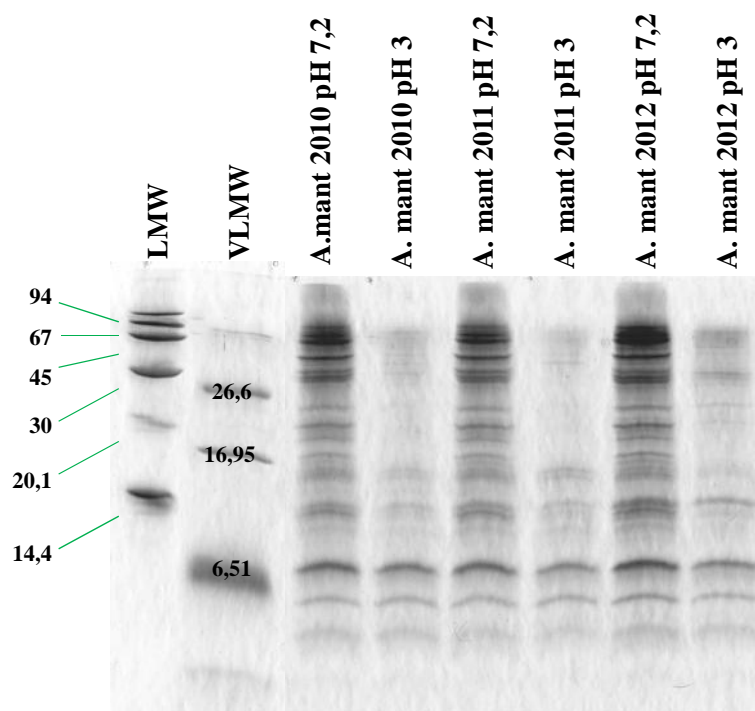


Figura RI.2 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE sin 2-ME. Aislados proteicos de *Amaranthus mantegazzianus* (A.mant 2010, 2011, 2012), solubilizados a pH 7,2 (A.mant año pH 7,2) y solubilizados a pH 3 (A.mant año pH 3). Patrones de muy bajo peso molecular, (VLMW); patrones de bajo peso molecular, (LMW).

4.1.1.3 Búsqueda de las condiciones óptimas de acción de la proteasa endógena

Para alcanzar nuestro objetivo, producir hidrolizados que presentaran actividad antitrombótica utilizando únicamente la incubación de los aislados de amaranto en

medio ácido, resultó necesario establecer las condiciones de reacción. Hemos visto que la proteasa se activa y escinde algunas especies proteicas que se encuentran en el aislado cuando se incuba la dispersión a pH 3 durante 100 minutos a temperatura ambiente. Ya que los péptidos con actividad antitrombótica descritos en la bibliografía consultada son mayoritariamente de pequeña masa molecular (Laudano y Doolittle, 1978; Ostrem y col., 1998; Marlowe y col., 2000; Atanassov y Tchorbanov, 2009), estudiamos las condiciones de pH, tiempo y temperatura de incubación que produjeran los mayores cambios sobre los perfiles electroforéticos del aislado, con la idea de que se generaran péptidos pequeños bioactivos.

I. Hidrolizados obtenidos a diferentes pHs

En la **Figura RI.3** se observan los perfiles electroforéticos del aislado, tomado como control (Asl), y del mismo tratado a diferentes pHs durante 3 horas a 40°C con agitación (1000rpm) en un agitador térmico. La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS PAGE + 2 ME).

En el perfil electroforético del aislado proteico, coincidente al obtenido en la **Figura RI.1**, se observan varias bandas intensas: una de $56,6 \pm 0,9$ kDa; una de 52 ± 1 kDa; dos bandas entre 30 y 45 kDa, de masa molecular 36 ± 1 y 31 ± 1 kDa, y una serie de bandas de masas moleculares cercanas a 20,1 kDa, de $26,2 \pm 1,4$; $21,5 \pm 1,1$ y 20 ± 1 kDa.

Con respecto al tratamiento de los aislados a distintos pHs se puede observar que a medida que el pH desciende desde 7 hasta 2 se observan cambios crecientes en los perfiles. Las bandas de 56 y 52 kDa disminuyen en intensidad o desaparecen; a pH 3 desaparece la de 52 kDa, mientras que la de 56 se observa aún a pH 2,5. La región del gel correspondiente a polipéptidos de masa molecular inferior a 20 kDa se tiñe más intensamente a medida que desciende el pH hasta 2, debido a la aparición de nuevas bandas de baja masa molecular que no son resueltas adecuadamente en este gel SDS-PAGE. El tratamiento a pH 2 presenta diferencias con respecto al resto de los pHs; por ejemplo la desaparición de la banda superior de 36 kDa. A los pHs 3,5 y 4,0 el perfil electroforético es muy similar al que muestra el control del aislado, indicando o bien que

la proteasa no es activa en esas condiciones de pH o que el tiempo de reacción es insuficiente.

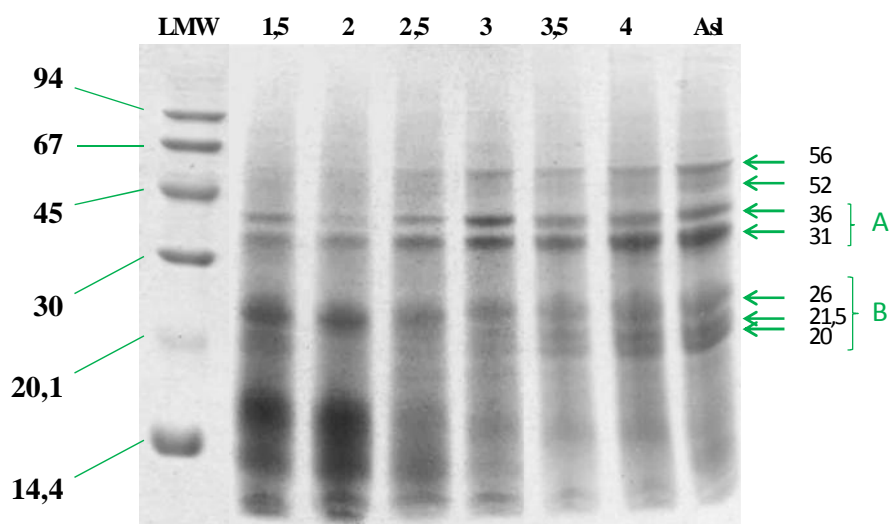


Figura RI.3 Electroforesis SDS-PAGE con 2-ME. Aislado proteico de amaranto: dispersado a pH 7 (Asl), aislado tratado a pH 1,5, (1,5); aislado tratado a pH 2,0, (2,0); aislado tratado a pH 2,5, (2,5); aislado tratado a pH 3,0, (3,0); aislado tratado a pH 3,5, (3,5); aislado tratado a pH 4,0, (4,0). Patrones de bajo peso molecular, (LMW).

Para visualizar con mejor resolución los polipéptidos generados por la proteasa endógena se realizó una electroforesis conteniendo tricina, ya que permite separar mejor péptidos de baja masa molecular (**Figura RI.4**).

A pHs 4,0 y 3,5 los perfiles electroforéticos son similares al control del aislado (Asl), por lo que en estas condiciones de pH no hay intensa actividad proteásica. En cambio, a pHs 2,5; 2,0 y 1,5 se observa una importante hidrólisis, evidenciada por la aparición de numerosas bandas de PM menor a 20,1 kDa, las cuales no están presentes en el aislado dispersado a pH 7. Estas bandas también pueden observarse en el perfil del aislado tratado a pH 3, el que si bien resultó muy tenue, permite apreciar la acción de la proteasa. Estos datos coinciden con los obtenidos por electroforesis SDS-PAGE.

Si bien en los perfiles electroforéticos obtenidos en presencia de tricina a partir del aislado tratado a pH 1,5; 2,0 y 2,5 se observa una gran cantidad de bandas de baja masa molecular, la electroforesis SDS-PAGE muestra una mayor escisión de polipéptidos de

mayor masa molecular a pH 2, y por eso se decidió trabajar a ese pH, lo cual no significa que sea el pH óptimo de la enzima.

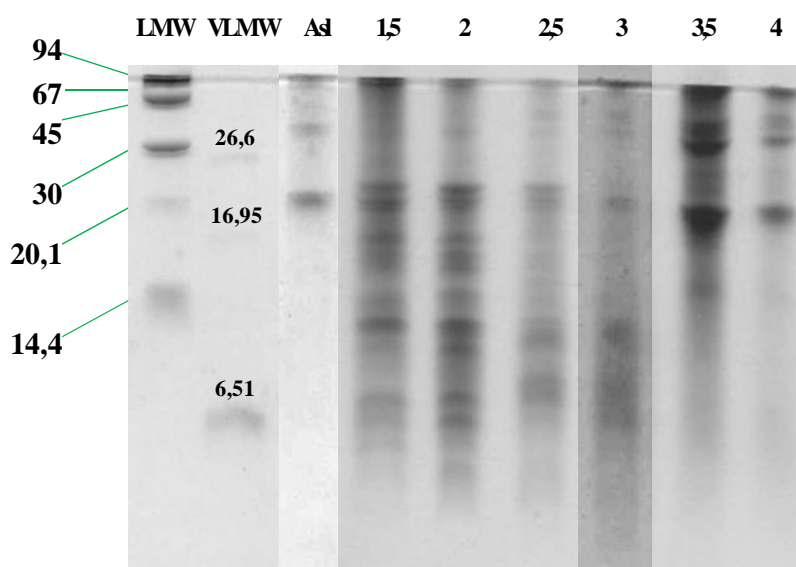


Figura RI.4 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE en presencia de 2-ME. Aislado proteico de amaranto: dispersado a pH 7 (AsI), tratado a pH 1,5 (1,5); tratado a pH 2,0 (2); tratado a pH 2,5 (2,5); tratado a pH 3,0 (3); tratado a pH 3,5 (3,5); tratado a pH 4,0 (4). Patrones de muy bajo peso molecular (VLMW); patrones de bajo peso molecular (LMW).

II. Hidrolizados obtenidos a distintas temperaturas de incubación

Con el fin de elegir la condición de temperatura para incubar las muestras a pH 2 se probaron diferentes temperaturas de reacción. En la **Figura RI.5** se muestra el perfil electroforético SDS-PAGE obtenido a partir de los aislados tratados a pH 2 durante 3 horas con agitación constante a 1000rpm incubados a diferentes temperaturas.

Como puede apreciarse en la **Figura RI.5**, aunque en todas las condiciones ensayadas existió actividad proteolítica, existen diferencias en los perfiles obtenidos. Cuando se utilizaron temperatura ambiente y 40°C, resultaron ser muy similares. Aun así, el tratamiento a 40°C fue la condición en la que se observa el menor número de bandas de alto peso molecular, ya que a esta temperatura la banda de 36 kDa es muy tenue, a diferencia de lo que ocurre en el resto de las condiciones.

Tanto a temperatura ambiente como a 40, 55 y 65°C, las bandas de 56 y 52 kDa se escinden en péptidos más livianos, los cuales se observan en la parte inferior del gel en

forma de numerosas bandas que difieren poco en su masa molecular, se definen pobremente y se presentan como una banda ancha en el gel, en la zona correspondiente a masas moleculares cercanas y menores a 14,4 kDa.

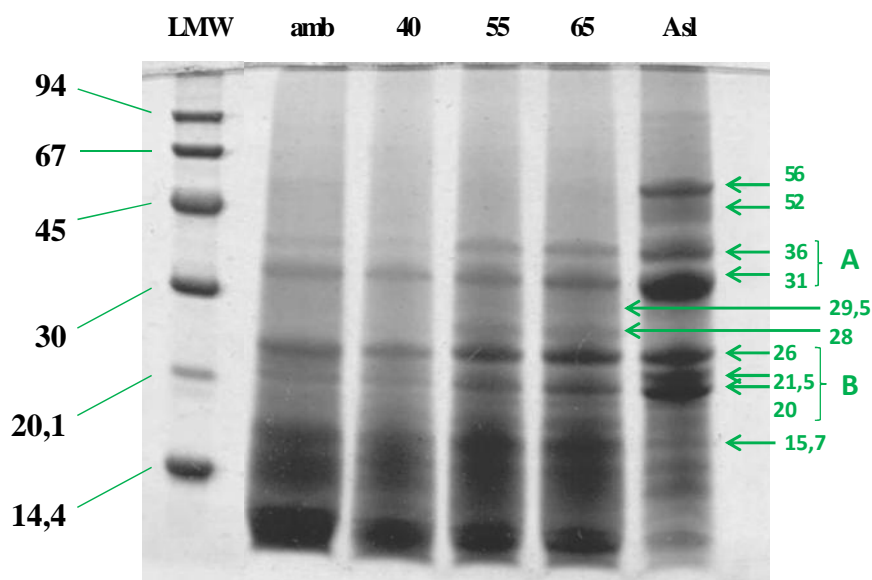


Figura RI.5 Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-ME. Aislado proteico de amaranto tratado a pH 2 temperatura ambiente (29°C, **amb**); a 40°C (**40**), a 55°C (**55**), a 65°C (**65**); a pH 7 y temperatura ambiente (**Asl**). Patrones de bajo peso molecular (**LMW**).

También podemos observar entre las bandas consideradas como 26 y 31 kDa a 55 y 65°C la aparición de dos bandas de baja intensidad (**Figura RI.5**), las cuales no están presentes en las otras dos condiciones de temperatura ni tampoco en el aislado control. Estos dos polipéptidos pueden ser productos intermedios de la hidrólisis en dichas condiciones de temperatura.

A temperatura ambiente y 40°C las dos bandas inferiores alrededor de 20,1 kDa desaparecen, pudiendo ser escindidos a péptidos de menor masa molecular.

En la **Figura RI.6** se muestra el perfil electroforético Tricina-SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol para las mismas muestras ensayadas en el gel SDS-PAGE descripto más arriba.

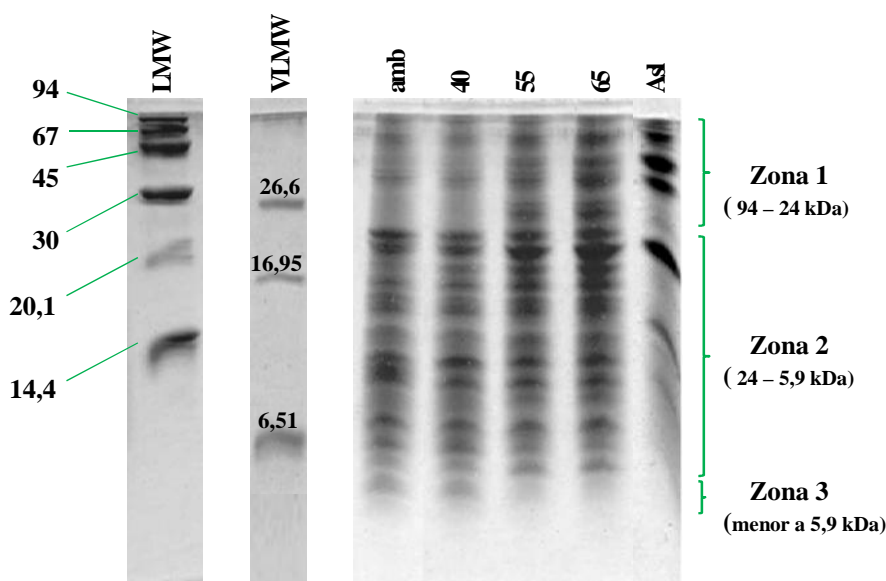


Figura RI.6 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE en presencia de 2-ME. Aislado proteico de amaranto tratado a pH 2 a temperatura ambiente (29°C, **amb**), a 40°C (**40**), a 55°C (**55**) y a 65°C (**65**); a pH 7 y temperatura ambiente (**AsI**). Patrones de muy bajo peso molecular (**VLMW**); patrones de bajo peso molecular (**LMW**).

Los perfiles electroforéticos obtenidos con las muestras tratadas a pH 2 y a diferentes temperaturas muestran la aparición de un gran número de polipéptidos entre 24 y 5,9 kDa (**Figura RI.6**, zona 2) ausentes en el aislado control, pudiéndose destacar algunas diferencias entre los mismos. En este gel se puede ver que a temperatura ambiente y a 40°C la hidrólisis es mayor, dado el menor número de bandas de alto peso molecular (**Figura RI.6**, zona 1) y a la aparición de una banda de $4,2 \pm 0,8$ kDa en la parte inferior del gel (**Figura RI.6**, zona 3) ausente en las otras dos condiciones de temperatura.

Estos resultados, que concuerdan con los obtenidos por SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol, nos permiten concluir que la proteasa es activa en un amplio rango de temperaturas generando una serie de péptidos de distintos pesos moleculares.

A partir de los resultados obtenidos y analizados se decidió trabajar a 40°C, condición en la cual se observaron los mayores cambios.

III. Hidrolizados obtenidos durante distintos tiempos de reacción

Una vez establecidas las condiciones de pH y temperatura, pH 2 y 40°C respectivamente, se evaluó la hidrólisis enzimática a distintos tiempos de reacción

mediante los perfiles electroforéticos SDS-PAGE (**Figura RI.7**) y Tricina-SDS-PAGE (**Figura RI.8**) con 2-mercaptoetanol.

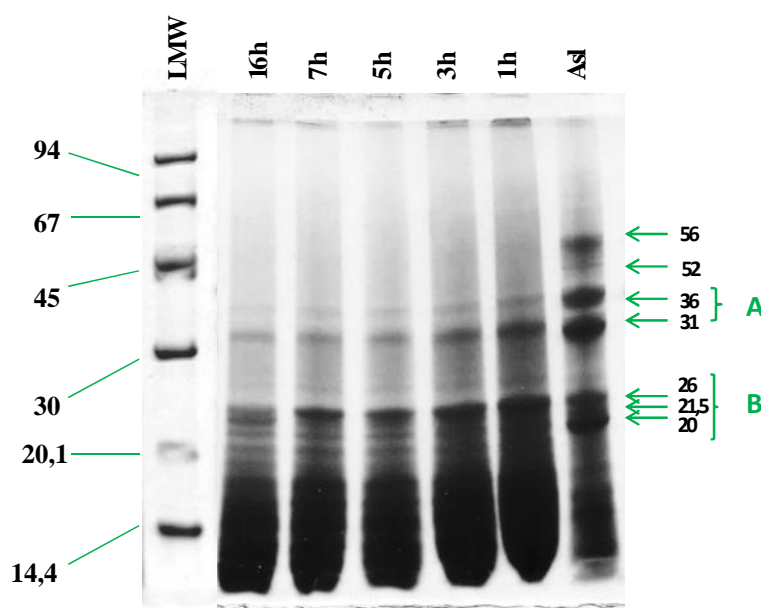


Figura RI.7 Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-ME. Aislado proteico de amaranto tratado a pH 2 y 40°C durante 1 hora (1h), 3 horas (3h), 5 horas (5h), 7 horas (7h) y 16 horas (16h); tratado a pH 7 y temperatura ambiente durante 1 hora (Aisl). Patrones de bajo peso molecular (LMW).

En la **Figura RI.7** se observa cómo el tiempo de incubación entre la proteasa y sus sustratos genera nuevos polipéptidos que se detectan como un conjunto de bandas en la parte inferior del gel, a la vez que otros de mayor PM desaparecen. Al cabo de una hora la proteasa ya muestra actividad proteolítica: las bandas de 56 y 52 kDa desaparecen totalmente del perfil, siendo uno de los primeros blancos de la enzima. Con el avance de la hidrólisis las bandas de 36 y 31 kDa disminuyen en intensidad. Cuando el tiempo de hidrólisis aumenta, el perfil se vuelve más definido y menos intenso en la zona de bajas masas moleculares indicando que esos polipéptidos son sustrato de la enzima y se convierten en otros aun más pequeños.

En la **Figura RI.8** se puede apreciar el gran número de polipéptidos y péptidos generados durante la hidrólisis independientemente del tiempo de incubación. Éstos como ya mencionamos abarcan un gran rango de masas moleculares, que va desde 26 hasta 4 kDa aproximadamente. El perfil del aislado tratado durante 1 hora a pH 2 (**Figura RI.8, 1h**) presentó algunas diferencias en la intensidad de las bandas que se

aprecian en la zona de masa molecular algo superior al patrón de 6,51 kDa. Los perfiles electroforéticos correspondientes a los restantes tiempos son prácticamente idénticos.

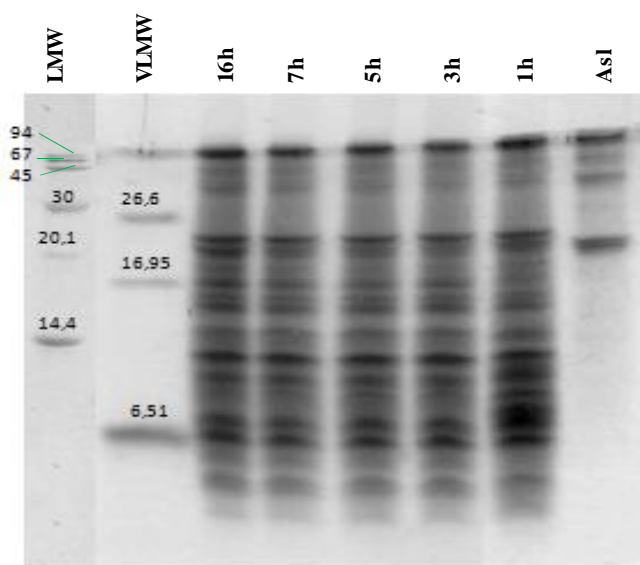


Figura RI.8 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE en presencia de reductor. Aislado proteico de amaranto tratado a pH 2 y 40°C 1 hora (**1h**), 3 horas (**3h**), 5 horas (**5h**), 7 horas (**7h**) y 16 horas (**16h**); aislado dispersado a pH 7 y 40°C durante 1 hora (**Asl**). Patrones de bajo peso molecular (**LMW**); patrones de muy bajo peso molecular (**VLMW**).

Ya que el análisis de estos resultados no nos permitió seleccionar un tiempo de incubación entre los ensayados, nos apoyamos en los valores del grado de hidrólisis que determinamos para estas muestras y que se detallan en la sección 4.1.2.2, para decidir el tiempo a utilizar. Se definió 16 horas como el tiempo de incubación para preparar el hidrolizado con la proteasa endógena.

4.1.2 Caracterización

Una vez establecidas las condiciones de incubación, se procedió a preparar el hidrolizado. Ambas muestras, el aislado (**Asl**) preparado con harina de *Amaranthus hypochondriacus* y el hidrolizado obtenido por activación de la proteasa endógena (**HdrE**) fueron caracterizadas.

4.1.2.1 Composición centesimal

Se determinó la composición del aislado proteico y del hidrolizado obtenido por

acción de la proteasa endógena (Hdr_E) de acuerdo a lo detallado en Materiales y métodos (3.2.1). Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la **Tabla RI.1**.

Tabla RI.1 Composición centesimal del aislado proteico de amaranto (Asl) y del hidrolizado obtenido por activación de la proteasa endógena (Hdr_E).

	<i>Composición centesimal (g/100 g de muestra)</i>			
	<i>proteínas</i>	<i>carbohidratos + fibra</i>	<i>cenizas</i>	<i>agua</i>
<i>Asl</i>	$82,4 \pm 1,6^b$	10,3	$2,4 \pm 0,1^a$	$4,9 \pm 0,2^a$
<i>Hdr_E</i>	$68,4 \pm 0,8^a$	12,0	$10,2 \pm 0,1^b$	$9,4 \pm 0,1^b$

Diferentes superíndices en la misma columna corresponden a valores diferentes ($\alpha = 0,05$, LSD).

Carbohidratos+fibra se calculó por diferencia.

La composición centesimal del aislado proteico (Asl) coincide con otras que han sido previamente determinadas en nuestro laboratorio (Condés y col., 2009; Ventureira, 2010; Ibañez, 2012). Se observan diferencias al comparar la composición del aislado con la del hidrolizado obtenido con la proteasa endógena. El contenido de minerales del hidrolizado, expresado como cenizas, es aproximadamente 5 veces mayor que el del aislado. Esto es el resultado de la acidificación (pH 2) y posterior alcalinización de la muestra (pH 9) para activar e inhibir a la proteasa endógena respectivamente. Estos procedimientos inciden directamente en el aumento del contenido salino del hidrolizado. También se observa que el contenido de agua del hidrolizado es aproximadamente el doble del que presenta el aislado. Como durante el proceso de hidrólisis aumenta la cantidad de grupos amino y carboxilos, los hidrolizados suelen ser más hidrofílicos que los aislados de los que provienen, y retienen mayor cantidad de agua en el proceso de liofilización o se hidratan parcialmente durante su manipulación. Sumando los macrocomponentes que se determinaron experimentalmente y restando de 100, se obtuvo el contenido de hidratos de carbono+fibras.

4.1.2.2 Determinación de la cinética y del grado de hidrólisis

La acción de la proteasa endógena se siguió midiendo el grado de hidrólisis (GH) a diferentes tiempos de reacción, mediante la determinación de la cantidad de grupos amino libres con el reactivo o-ftalaldehído (OPA). Para eso se tomaron alícuotas

representativas a partir de las dispersiones del aislado de amaranto tratadas a pH 2 y 40°C a distintos tiempos, 1, 3, 5, 7 y 16 horas, durante la reacción, y se determinó el grado de hidrólisis en cada una de ellas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura RI.9**. A partir de la misma se puede apreciar que el grado de hidrólisis aumenta con el tiempo y que la pendiente de la curva entre 7 y 16 horas es menor que la pendiente entre 1 y 7 horas, indicando una disminución de la velocidad de hidrólisis. El cambio de pendiente podría deberse al agotamiento del sustrato o a la inactivación parcial de la enzima (Márquez y Vázquez, 1999; Walsh y col., 2010).

El grado de hidrólisis más elevado se alcanzó a las 16 horas de incubación y fue de $5,3 \pm 0,4$ %. Como puede observarse, no es un valor muy alto. Debe tenerse en cuenta que la relación enzima/sustrato no está controlada, dado que es la existente en la semilla, y no es conocida, lo cual puede ser una explicación al bajo GH obtenido.

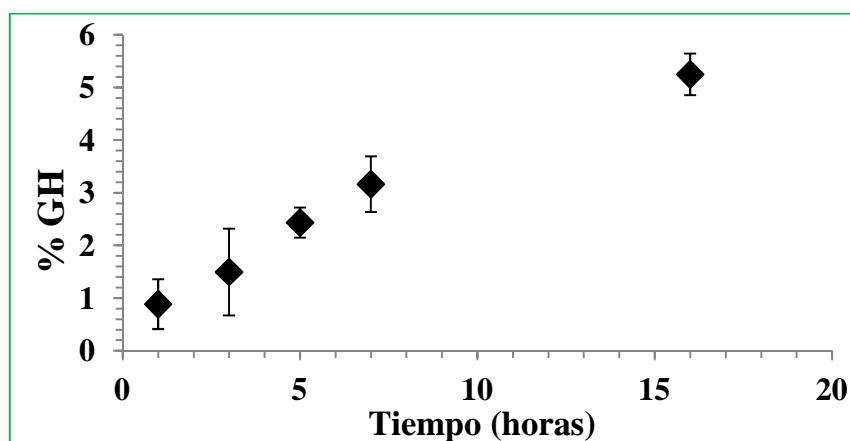


Figura RI.9 Cinética de hidrólisis del aislado proteico de amaranto por activación de la proteasa endógena. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

4.1.2.3 Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)

A efectos de visualizar los cambios sufridos por las proteínas de amaranto como consecuencia de la hidrólisis se analizaron las variaciones en la masa molecular de las mismas mediante cromatografía de exclusión molecular, que permite separar fracciones proteicas en base a sus tamaños moleculares. Para calcular la masa de las especies se utilizó la curva de calibración indicada en Materiales y métodos (3.2.4.1).

Los cromatogramas obtenidos para las diferentes muestras se observan en la **Figura RI.10**. A efectos de facilitar el análisis, se establecieron tres zonas en los cromatogramas, correspondientes a los volúmenes de elución que se encuentran indicados en la leyenda de la **Figura RI.10**. Las zonas se muestran en la **Figura RI.10** con marcos de color verde, rojo y azul. En la zona enmarcada en verde eluyen especies cuyas masas moleculares son superiores a 100 kDa, en la zona enmarcada en rojo, especies moleculares entre 100 y 1 kDa aproximadamente, y en la zona enmarcada en azul especies con masa molecular menor a 1 kDa.

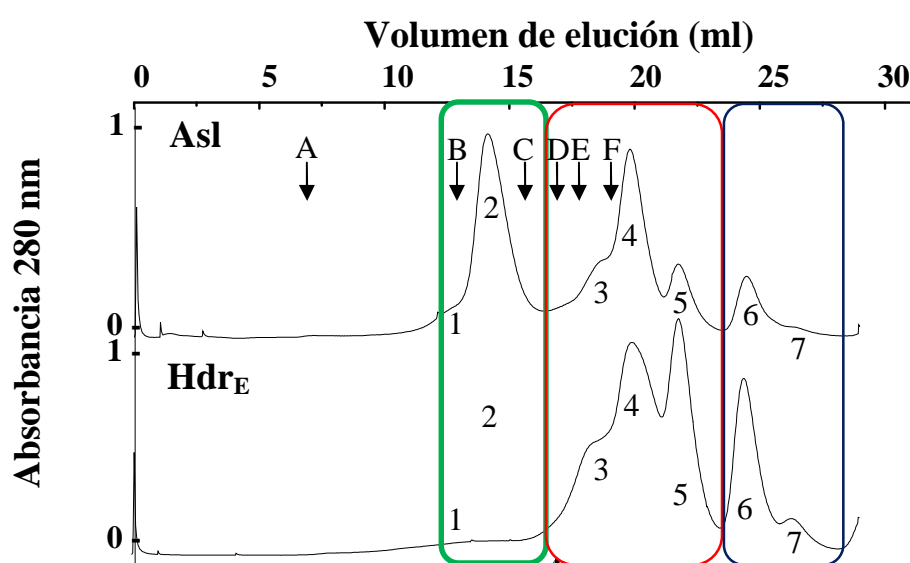


Figura RI.10 Cromatogramas del aislado (**AsI**) e hidrolizado obtenido por activación de la proteasa endógena (**Hdr_E**) eluidos con buffer 28 mM Na₂HPO₄ y 7 mM NaH₂PO₄, pH 7,8. Los recuadros de color indican tres zonas de interés: volúmenes de elución entre 12,5-16,5 ml, **verde**; entre 16,5-23,5 ml, **rojo**; y entre 23,5-27,5 ml, **azul**. La columna se calibró con azul dextrano (**A**), tiroglobulina (**B**), alcohol deshidrogenasa (**C**), albúmina (**D**), ovoalbúmina (**E**), y ribonucleasa (**F**).

El perfil cromatográfico del aislado proteico de amaranto (**Figura RI.10**) muestra la presencia de polímeros ubicados en la zona verde, moléculas de globulina P y 11S de 280-360 kDa descritos por Martínez y col., 1997 y Scilingo y col. 2002 y moléculas de globulina 7S de 180-220 kDa, descritos por Marcone y col., 1999 y Quiroga y col., 2010. En las zonas roja y azul se encuentran presentes especies de masa molecular menor a 100 kDa, posiblemente correspondientes a albúminas y a subunidades disociadas de las globulinas. El cromatograma del aislado presenta un perfil similar al obtenido por

Condés y col. (2009) donde se destacan cuatro picos de importancia a volúmenes de elución de 14, 20, 23 y 25 ml.

En el cromatograma del hidrolizado obtenido por acción de la proteasa endógena se observa que desaparecen las especies proteicas que eluyen en el aislado en la zona verde, mientras que se modifica la proporción de las que eluyen en la zona roja y aumentan las especies de menor tamaño, zona azul (**Tabla RI.2**). Estos cambios se deberían no sólo a la reacción de hidrólisis, donde las proteínas son sustrato de la proteasa endógena dando lugar a especies de menor tamaño molecular, sino también al efecto desnaturalizante y disociante del medio ácido en el que se activa la enzima (Abugoch y col., 2010).

A efectos de cuantificar los cambios entre las muestras estudiadas se calcularon las áreas porcentuales de los picos (**Tabla RI.2**). Para eso se calculó el área total encerrada bajo el cromatograma y la correspondiente a cada pico. El tratamiento de los datos se realizó con el programa Origin 8.0, empleando la función *peak analyzer*. La relación entre el área de cada pico y la total se multiplicó por cien. En la **Tabla RI.2** se presentan además las masas moleculares de los máximos de los picos, calculadas empleando la ecuación de calibración (Materiales y métodos 3.2.4.1), los respectivos volúmenes de elución correspondientes a los máximos de absorbancia y las sumas de las áreas porcentuales de cada zona. Para identificarlos claramente, los picos se encuentran indicados con los mismos números en la Tabla y en la Figura en la que se observan los cromatogramas.

Tabla RI.2 Masa molecular (kDa) de las especies separadas en los cromatogramas de exclusión molecular del AsI y Hdr_E, sus respectivos volúmenes de elución y áreas porcentuales.

		<i>verde</i>		<i>roja</i>			<i>azul</i>	
<i>ZONA</i>		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>Pico número</i>		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
<i>Vol elución (ml)</i>		12,1	14,4		19,9	21,8	24,4	26,3
<i>Masa molecular máximo del pico (kDa)</i>		830,0	255,7		8,9	3,0	0,6	0,2
<i>AsI</i>	<i>% Área zona</i>	39,7		50,1			10,2	
	<i>% Área pico^a</i>	nd	39,7	*	40,0	10,1	10,2	-
<i>Hdr_E</i>	<i>% Área zona</i>	0		75,1			24,9	
	<i>% Área pico^a</i>	-	-	*	51,6	23,5	20,6	4,3

*el área del pico 3 se presenta sumada al área del pico 4

^a área pico/área total x 100

Los cambios observados en el perfil cromatográfico del hidrolizado dan cuenta de una gran modificación en la estructura de las proteínas. Estas modificaciones podrían deberse tanto al efecto disociante y desnaturalizante del medio ácido, como a la acción proteolítica de la proteasa endógena. Ambos efectos se visualizan juntos en los cromatogramas, ya que aunque las especies proteicas no han sido muy proteolizadas, GH relativamente pequeño, la estructura cuaternaria de las proteínas nativas no se mantiene.

4.1.3 Estudio de la actividad antitrombótica *in vitro*

La potencial actividad antitrombótica de las proteínas y péptidos de amaranto se evaluó mediante el ensayo de las microplacas descrito por Yang y col. (2006) y modificado por Zhang y col. (2008). En el ensayo se enfrentan el sustrato, fibrinógeno, con la enzima, trombina, que es capaz de producir los monómeros de fibrina que polimerizarán, generando un coágulo que se puede observar midiendo la turbidez a 405 nm en un espectrofotómetro especial para microplacas. De este modo, el método permite estudiar la habilidad de una muestra para impedir completa o parcialmente la formación del coágulo de fibrina, observándose entonces el desarrollo de menor o de ninguna turbidez, mediante la lectura espectrofotométrica.

El ensayo emula la última etapa de la coagulación de la sangre, llamada vía común de la coagulación. La acción inhibitoria de los péptidos presentes en la muestra podrá ser ejercida a través de dos mecanismos. Un posible mecanismo de acción involucra la inhibición de la trombina, por unión al sitio activo o a uno de los dos exositos que posee la enzima, impidiendo de esa forma la proteólisis del fibrinógeno. El segundo mecanismo a través del cual los péptidos podrían impedir la formación del coágulo implicaría que los péptidos presenten secuencias capaces de unirse a los monómeros de fibrina formados, impidiendo su polimerización (Laudano y Doolittle, 1978).

Se determinó la actividad antitrombótica *in vitro* del aislado y del hidrolizado obtenido por activación de la proteasa endógena empleando el método de las

microplacas. El aislado no presentó inhibición de la coagulación a ninguna de las concentraciones analizadas en este trabajo (0,17-12 mg de proteína/ml). La **Figura RI.11** muestra la curva de inhibición de la coagulación en función de la concentración de proteínas para el Hdr_E. En este caso se observa un comportamiento del tipo dosis-respuesta; se ve que el hidrolizado presentó actividad inhibitoria a partir de 0,77 mg proteína/ml. A concentraciones más altas, la inhibición aumenta con la concentración hasta que se alcanza un *plateau*, aproximadamente a 13 mg/ml. Los puntos experimentales obtenidos se ajustaron empleando el programa GraphPad Prism 5, el cual permite obtener la concentración que provoca el 50% de la inhibición de la coagulación, IC₅₀. Para esta muestra, dicha concentración resultó igual a $5,9 \pm 0,1$ mg de proteína/ml.

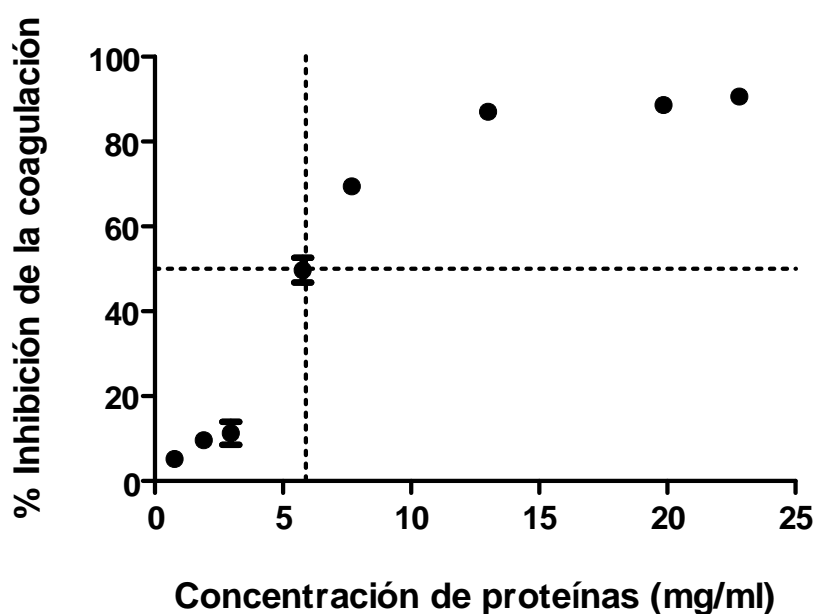


Figura RI.11 Curva de inhibición de la coagulación del hidrolizado con la proteasa endógena. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Este resultado comprueba la efectividad del tratamiento de hidrólisis por activación de la proteasa endógena para producir péptidos con actividad antitrombótica. Al comparar el aislado control con su hidrolizado se puede ver que evidentemente la hidrólisis y el tratamiento ácido han liberado péptidos o polipéptidos que ejercen actividad antitrombótica, los cuales se encontraban encriptados en las proteínas. La información recabada en la bibliografía muestra que los péptidos con actividad

antitrombótica que están estudiados presentan tamaño pequeño (Maruyama y col., 1993; Barnes y col., 1996; Ashmarin y col., 1998; Lee y col., 2005; Hyun y col., 2006) aunque algunos descriptos presentan mayor masa molecular (Jo y col., 2008; Huang y col., 1987; Gan y col., 1988). En general corresponden a péptidos que presentan aminoácidos básicos en posiciones definidas de su secuencia. Resulta interesante el hecho de que, aunque el grado de hidrólisis alcanzado con la proteasa endógena es relativamente bajo, la actividad inhibitoria de la coagulación de este hidrolizado, expresada como IC_{50} , resultó buena comparada con la informada por Zhang y col. (2008) y Yang y col. (2007), quienes empleando la misma metodología informaron IC_{50} de 30 mg/ml y >50 mg/ml para proteínas de semilla de colza e hidrolizados de clara de huevo respectivamente.

4.2 Preparación de hidrolizados proteicos de amaranto por hidrólisis con las proteasas alcalasa y tripsina

El uso de enzimas comerciales en la preparación de hidrolizados proteicos es muy frecuente (Shahidi y col., 1994; Dufossé y col., 1997; Gibbs y col., 2004; Benítez y col., 2008; Eckert y col., 2013; Dąbrowska y col., 2013). Siempre que los hidrolizados obtenidos sean potenciales ingredientes de alimentos, es necesario que las enzimas elegidas se encuentren entre las que sean de grado alimentario. Las dos enzimas comerciales utilizadas en este trabajo, alcalasa y tripsina, cumplen con ese requisito. Ambas se han utilizado separadamente en nuestro laboratorio para obtener hidrolizados que presenten mejores propiedades funcionales, como por ejemplo mayor solubilidad de las proteínas (Condés y col., 2009) o mejores propiedades de superficie (Condés y col., 2009; Ventureira y col., 2012) o productos con determinadas propiedades biológicas, como actividad antihipertensiva (Quiroga y col., 2012), antioxidante (Orsini y col., 2011) o antitumoral (Barrio y col., 2009).

En este trabajo las enzimas se utilizaron por primera vez en forma secuencial (Materiales y métodos 3.1.5.2) con el fin de obtener elevado grado de hidrólisis, para conseguir péptidos pequeños, en tiempos de reacción relativamente cortos.

Para obtener los hidrolizados se prepararon dispersiones del aislado proteico de

amaranto en agua como se describió en Materiales y métodos (3.1.5.2). Al inicio del ensayo, el pH de las dispersiones proteicas se ajustó a 10 y enseguida se agregó la solución de alcalasa. La alcalasa es una proteasa alcalina de origen microbiano. Si bien su pH óptimo es 9 (Vieira y col., 2011), a pH 10 al que se llevó la dispersión, la enzima presenta alta actividad y los aislados proteicos de amaranto excelente solubilidad. A medida que progresó la reacción de hidrólisis el pH de la dispersión descendió, como ocurre por acción de todas las proteasas alcalinas, ya que se produce la liberación de protones del grupo amino. De esta forma, unos 20 minutos después de iniciada la proteólisis el pH de la dispersión se acercaba a 8, pH muy cercano al óptimo para la actividad de la tripsina. En ese momento, se agregó la tripsina, enzima proteolítica proveniente de páncreas porcino y se continuó la incubación durante 20 minutos más. La reacción se detuvo por calentamiento de la mezcla de reacción a 85°C durante 10 minutos y los hidrolizados se liofilizaron.

Los aislados proteicos que se utilizaron para esta parte del trabajo se prepararon a partir de harina desgrasada proveniente de semillas de *Amaranthus mantegazzianus*, tal como se describió en Materiales y métodos (3.1.3). El rendimiento de la obtención de los mismos se calculó después de realizar varias preparaciones y resultó igual a $8,3 \pm 0,3$ g de aislado proteico cada 100 g de harina desgrasada. El resultado obtenido fue similar a obtenido con el aislado de *Amaranthus hypochondriacus* ($8,9 \pm 0,1$ g de aislado proteico cada 100 g de harina desgrasada) con el que se preparó el hidrolizado mediante activación de la proteasa endógena. Además coincide con los valores informados por Martínez (1997).

4.2.1 Caracterización

4.2.1.1 Composición centesimal

Se determinó la composición del aislado proteico y del hidrolizado obtenido por acción de las enzimas alcalasa y tripsina (Hd_{rat}). Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la **Tabla RI.3**.

Tabla RI.3 Composición centesimal del aislado proteico de amaranto (Asl) y del hidrolizado obtenido por acción de las enzimas alcalasa y tripsina (Hdr_{AT}).

	Composición centesimal (g/100 g de muestra)			
	<i>proteínas</i>	<i>carbohidratos + fibra</i>	<i>cenizas</i>	<i>agua</i>
<i>Asl</i>	73,8 ± 1,0 ^a	16,9	3,1 ± 0,3 ^a	5,8 ± 0,3 ^b
<i>Hdr_{AT}</i>	72,1 ± 1,0 ^a	14,0	9,6 ± 0,9 ^b	4,1 ± 0,2 ^a

Diferentes superíndices en la misma columna corresponden a valores diferentes ($\alpha = 0,05$, LSD).

Carbohidratos+fibra se calculó por diferencia.

La composición del hidrolizado proteico fue similar a la del aislado de amaranto. Comparando el hidrolizado con el aislado se observa un aumento en el porcentaje de cenizas asociado al agregado de NaOH para llevar la dispersión a pH 10 antes de comenzar la reacción de hidrólisis, tal como se describió en Materiales y métodos.

Analizando comparativamente la composición centesimal del aislado e hidrolizado de la **Tabla RI.3** respecto a aquellos de la **Tabla RI.1** (empleados para el estudio de la proteasa endógena) puede observarse que, aunque el contenido proteico del aislado varía en más de un 5%, ambos valores obtenidos se encuentran dentro del rango de concentraciones proteicas encontradas en nuestro laboratorio (Condés y col., 2009: 75,4 ± 0,5 g/100 g aislado; Orsini y col., 2011: 72,4 ± 3,4 g/100 g aislado; Ventureira y col., 2012: 83,1 ± 0,5 g/100 g aislado). Respecto al contenido de agua los aislados presentan valores similares, mientras que el Hdr_{AT} exhibe un valor inferior al de Hdr_E (**Tabla RI.1**). Esta diferencia puede deberse o bien a la liofilización, al tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra y la realización de la determinación, o a la calidad del almacenamiento, las cuales en conjunto pueden establecer la variabilidad que encontramos en el valor de humedad, ya que los hidrolizados son altamente hidrofílicos. En estas muestras, preparadas con *Amaranthus mantegazzianus* puede observarse mayor contenido de carbohidratos+fibras que el que informamos para el aislado presentado en la **Tabla RI.1**.

4.2.1.2 Determinación de la cinética y del grado de hidrólisis

Durante la preparación de los hidrolizados y a fin de seguir la reacción de hidrólisis se tomaron alícuotas a las que se les determinó el contenido de grupos amino

libres mediante el método del TNBS. Con esos datos se calculó el grado de hidrólisis durante el transcurso y al final de la reacción como se indicó en Materiales y métodos (3.2.2.1). Los resultados se presentan en la **Figura RI.12**.

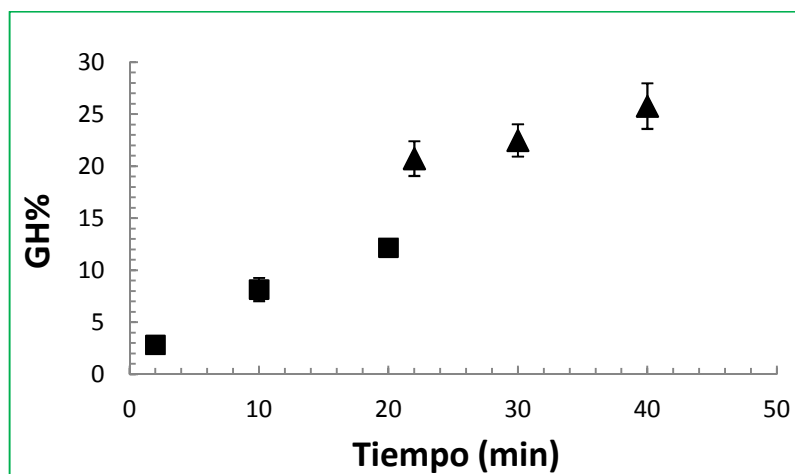


Figura RI.12 Cinética de hidrólisis del aislado proteico de amaranto. Alcalasa (cuadrados) y alcalasa+tripsina (triángulos). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

La **Figura RI.12** presenta la evolución del grado de hidrólisis (GH%) con el tiempo obtenido empleando el método del TNBS. El GH% determinado sobre alícuotas tomadas a distintos tiempos (2, 10 y 20 minutos de reacción con alcalasa y 2, 10 y 20 minutos una vez adicionada la tripsina), aumenta en función del tiempo desde el inicio de la hidrólisis. El GH% presentó un brusco incremento al incorporar la tripsina y aumentó luego más lentamente durante el transcurso de los últimos 20 minutos de reacción. Este comportamiento podría deberse a que la acción de la alcalasa sobre las proteínas de amaranto genere cambios en la estructura que permiten la exposición de numerosos sitios de corte sobre los que actuaría la tripsina y/o a que las proteínas de amaranto tengan más uniones peptídicas sensibles a tripsina. Las cinéticas de proteólisis realizadas nos permitieron observar que el GH% aumenta significativamente con el tiempo de reacción en todas las muestras estudiadas ($\alpha = 0,05$, LSD), siendo ambas enzimas capaces de hidrolizar al aislado de amaranto de manera efectiva. El producto final presenta un GH% de $25,8 \pm 2,2$ en el término de 40 min y nos permite concluir que el tratamiento con

las dos enzimas resulta apropiado para obtener productos de alto grado de hidrólisis en un corto lapso de tiempo.

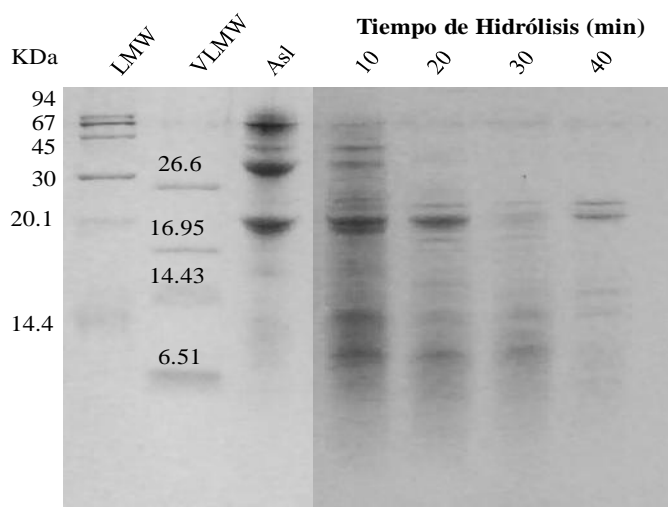


Figura RI.13 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE con 2-ME. Aislado de amaranto (AsI) y su hidrolizado a diferentes tiempos de reacción (10 y 20 minutos, con alcalasa, y 30 y 40 minutos con alcalasa+tripsina). LWM: patrones de bajo peso molecular. VLMW: patrones de muy bajo peso molecular.

La **Figura RI.13** muestra los perfiles electroforéticos obtenidos en geles de tricina con el aislado de amaranto y los hidrolizados obtenidos con alcalasa y tripsina durante diferentes tiempos de hidrólisis. El aislado de amaranto presentó un perfil electroforético similar a los descritos anteriormente en este capítulo. Cuando se somete a hidrólisis, el perfil electroforético se modifica. Se observa un gran aumento del número e intensidad de bandas de PM menor a 26 kDa aún a tiempos cortos de reacción. Cuando el tiempo de hidrólisis aumenta el perfil se vuelve más tenue, indicando que esos mismos péptidos son sustrato de las enzimas y se convierten en otros aún más pequeños.

4.2.1.3 Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)

El efecto de la hidrólisis sobre las proteínas de amaranto puede observarse también en la **Figura RI.14**. A efectos de facilitar el análisis de los cromatogramas, éstos se dividieron nuevamente en tres zonas: verde, roja y azul. En la zona verde eluyen, como se indicó previamente, especies cuyas masas moleculares son superiores a 100 kDa,

en la zona roja especies moleculares entre 100 y 1 kDa aproximadamente, y en la zona azul especies con masa molecular menor a 1 kDa.

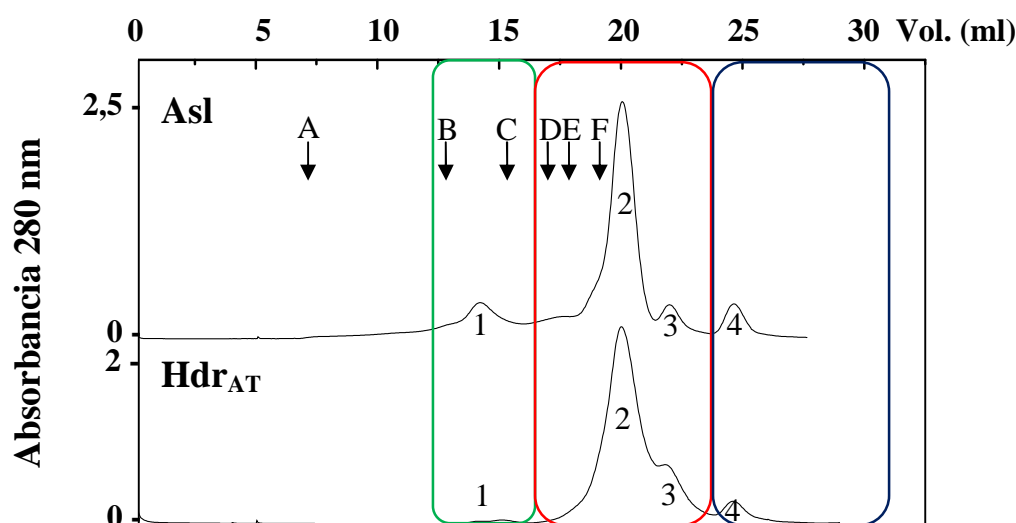


Figura RI.14 Cromatogramas del aislado (**Asl**) e hidrolizado por alcalasa+tripsina (**Hdr_{AT}**) eluidos con buffer 28 mM Na₂HPO₄ y 7 mM NaH₂PO₄, pH 7,8. Los recuadros de color indican tres zonas de interés (volúmenes de elución entre 12,5-16,5 ml, **verde**; entre 16,5-23,5 ml, **rojo**; y entre 23,5-27,5 ml, **azul**). La columna se calibró con azul dextrano (**A**), tiroglobulina (**B**), alcohol deshidrogenasa (**C**), albúmina (**D**), ovoalbúmina (**E**), y ribonucleasa (**F**).

Para cuantificar los cambios entre las muestras estudiadas se calcularon las áreas porcentuales de los picos tal como se describió anteriormente en la sección 4.1.2.3. En la **Tabla RI.4** se presentan, al igual que en la **Tabla RI.2**, las masas moleculares de los máximos de los picos y sus respectivos volúmenes de elución, y las sumas de las áreas porcentuales de los picos presentes en cada zona. Para identificarlos claramente, éstos se encuentran indicados con números en la Tabla y en la Figura en la que se observan los cromatogramas.

El perfil cromatográfico del aislado (**Figura RI.14**) es diferente al previamente descrito en la **Figura RI.10** para el aislado de *A. hypochondriacus*. Ya que en los cromatogramas se analizan únicamente las fracciones solubles en las condiciones antes discutidas o en el buffer del ensayo, este perfil refleja una mayor agregación que involucra principalmente a las moléculas de masa superior a 100 kDa. Este aislado, preparado con harina de *A. mantegazzianus*, presentó en buffer pH 7,2 una solubilidad significativamente inferior ($37 \pm 2,1\%$) a la determinada para el aislado de *A.*

hypochondriacus ($52 \pm 1,4\%$) cuyo perfil cromatográfico se muestra en la **Figura RI.10**. En el cromatograma del aislado hidrolizado con alcalasa+tripsina (**Figura RI.14**) no se detectan especies moleculares en la zona de mayor masa molecular (zona verde), mientras que el área de los picos que aparecen en la zona correspondiente a las especies de masa molecular menor a 100 kDa aumenta significativamente (50,1% del área para *A. hypochondriacus* y 73,8% del área para *A. mantegazzianus*), desplazándose además el máximo del pico levemente a volúmenes mayores.

Tabla RI.4 Masa molecular (kDa) de las especies separadas en los cromatogramas de exclusión molecular del Asl y Hdr_{AT}, sus respectivos volúmenes de elución y áreas porcentuales.

	ZONA	verde	roja		azul
	Pico número	1	2	3	6
	Vol elución (ml)	14,2	20	21,9	24,6
	Masa molecular máximo del pico (kDa)	244,8	8,4	8,9	0,6
Asl	% Área zona	18,2	73,8		7,6
	% Área pico*	18,6	66,5	7,3	7,6
Hdr _{AT}	% Área zona	0	92,0		8,0
	% Área pico*	-	75,4	16,6	8,0

* área pico/área total x 100

Resulta sorprendente observar que, a pesar de que el grado de hidrólisis es relativamente alto, no se detecta aumento del área de la zona azul en el cromatograma del Hdr_{AT} (moléculas pequeñas, **Figura RI.14**). Una posible explicación sería que la proteólisis se produzca en las moléculas, pero ellas queden unidas en estructuras cuyas masas moleculares correspondan a la zona roja de la **Figura RI.14**, que sí se incrementa después de la hidrólisis, y/o que el tamaño final de los péptidos obtenidos sea superior a 1 kDa. Es interesante también tener presente que el aislado de partida presenta una importante agregación (considerando el cromatograma obtenido y su baja solubilidad) y que la reacción de hidrólisis se detuvo mediante un tratamiento térmico, lo que podría favorecer esta tendencia.

4.2.2 Estudio de la actividad antitrombótica *in vitro*

Se determinó la actividad antitrombótica *in vitro* del aislado y del hidrolizado por las proteasas alcalasa y tripsina empleando el método de las microplacas. El aislado proteico de amaranto no inhibió la coagulación a ninguna de las concentraciones estudiadas, siendo coincidente este resultado con el mencionado anteriormente en la sección 4.1.3. Al estudiar la bioactividad del hidrolizado se observó nuevamente una inhibición de la formación del coágulo de fibrina, dependiente de la concentración de proteínas empleada. Con los resultados obtenidos se construyó la curva de inhibición del tipo dosis-respuesta que se presenta en la **Figura RI.15**.

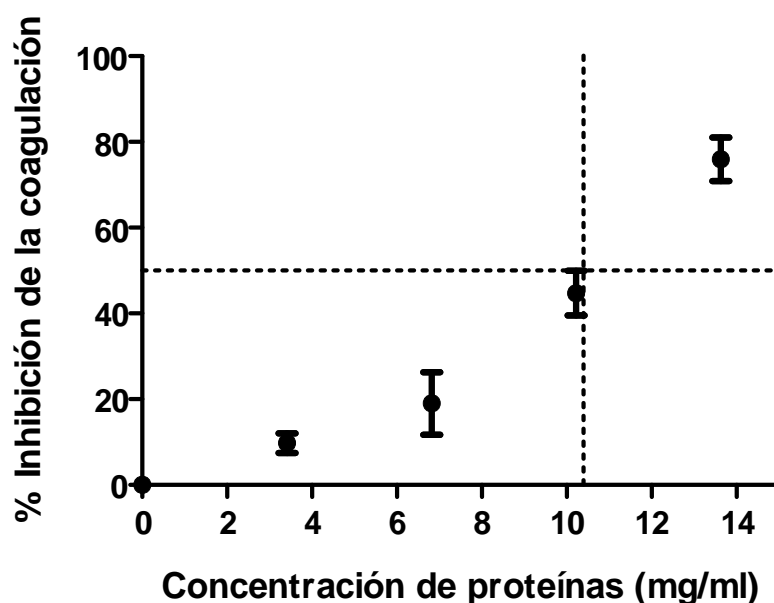


Figura RI.15 Curva de inhibición de la coagulación del hidrolizado con la proteasas alcalasa y tripsina. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

El hidrolizado inhibe la formación del coágulo a partir de 3 mg de proteína/ml. Los puntos experimentales obtenidos (**Figura RI.15**) se ajustaron empleando el programa GraphPad Prism 5, y se calculó el IC₅₀. Para esta muestra, dicha concentración resultó igual a $10,9 \pm 0,1$ mg de proteína/ml. Este resultado muestra otra vez la efectividad del tratamiento proteolítico para liberar péptidos con potencial actividad antitrombótica que se encontraban inicialmente encriptados en las proteínas nativas. El IC₅₀ del Hdr_{AT} presentó un valor superior a aquel obtenido por el Hdr_E indicando que es necesaria una mayor concentración de Hdr_{AT} para inhibir la formación del coágulo de fibrina en un

50% comparada con Hdr_E. Sin embargo, un IC₅₀ de 10,9 ± 0,1 mg de proteína/ml se encuentra en el rango de IC₅₀ encontrados por Kee y col. (2008), quien estudió la actividad antitrombótica de extractos de una gran cantidad de plantas sudafricanas y obtuvo valores de IC₅₀ de entre 2,5 y 25 mg/ml. El resultado obtenido también es comparable con los informados por Zang y col. (2008) y Yang y col. (2007) quienes empleando la misma metodología informaron IC₅₀ de 30 mg/ml y >50 mg/ml para proteínas de semilla de colza e hidrolizados de clara de huevo respectivamente, tal como se indicara previamente.

4.3 Preparación de hidrolizados proteicos de amaranto mediante digestión gastrointestinal simulada

Ya que el fin último del estudio de estas proteínas vegetales es utilizarlas como ingredientes alimentarios con actividad biológica, debemos asegurarnos que la actividad en cuestión se conserve durante la ingesta, digestión y absorción. Decidimos entonces someter al aislado de *Amaranthus hypochondriacus* a digestión gastrointestinal simulada. El tratamiento utilizado emula el paso por el estómago, acidificando y utilizando pepsina, y el encuentro con las enzimas pancreáticas en el intestino delgado proximal. Para este segundo paso se añadió una mezcla de enzimas (lipasas, proteasas y amilasas) conocida como pancreatina, una vez que el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 6. Las condiciones se encuentran descritas previamente en la sección 3.1.5.3 de Materiales y métodos. La reacción se detuvo por tratamiento térmico de la mezcla a 85°C durante 10 minutos.

4.3.1 Caracterización

4.3.1.1 Composición centesimal

Se determinó la composición del aislado proteico y del hidrolizado obtenido por digestión gastrointestinal simulada (Hdr_{DGS}). Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la **Tabla RI.5**.

Tabla RI.5 Composición centesimal del aislado proteico de amaranto (Asl) y del hidrolizado obtenido por simulación de la digestión gastrointestinal (Hdr_{DGS}).

	<i>Composición centesimal (g/100 g de muestra)</i>				
	<i>proteínas</i>	<i>carbohidratos</i>	<i>cenizas</i>	<i>agua</i>	<i>fibras*</i>
<i>Asl</i>	71,3 ± 1,5 ^b	9,0 ± 0,8 ^b	3,6 ± 0,1 ^a	6,4 ± 0,6 ^a	9,7
<i>Hdr_{DGS}</i>	55,5 ± 0,9 ^a	5,3 ± 1,0 ^a	17,4 ± 0,1 ^b	12,5 ± 1,4 ^b	9,3

Diferentes superíndices en la misma columna corresponden a valores diferentes ($\alpha = 0,05$, LSD).

*El contenido de fibras se calculó por diferencia.

La composición centesimal del aislado proteico (Asl) es coincidente con las anteriormente descritas en las secciones previas. El porcentaje de proteínas obtenido se encuentra dentro del rango de concentraciones proteicas encontradas en nuestro laboratorio (Condés y col., 2009; Orsini y col., 2011; Ventureira y col., 2012). El contenido de fibras, calculado por diferencia, resultó elevado, aproximadamente 10%. Esta diferencia respecto a lo descrito para los aislados antes mencionados, en los que la suma de carbohidratos+fibra resultó algo menor, se explica teniendo en cuenta que estas muestras fueron preparadas con harina de *Amaranthus hypochondriacus* sin tamizar, tal como se mencionó en Materiales y métodos (3.1.2).

Respecto al hidrolizado proteico, se observan marcadas diferencias al compararlo con la composición del aislado. El contenido de minerales del Hdr_{DGS}, expresado como cenizas, es aproximadamente 5 veces mayor que el del aislado. Los cambios de pH efectuados durante la realización de la digestión gastrointestinal simulada, seguido de la neutralización de la mezcla de reacción previa a la liofilización de la muestra, provocan este aumento. También se observa que el contenido de agua del hidrolizado es aproximadamente el doble del que presenta el aislado, debido a la mayor hidrofiliidad del hidrolizado por un aumento de la cantidad de grupos amino y carboxilos. El Hdr_{DGS} retiene mayor cantidad de agua en el proceso de liofilización o se hidrata parcialmente durante su manipulación. El contenido proteico del hidrolizado es significativamente inferior al del aislado debido a que un aumento en el porcentaje de cenizas y humedad implica una disminución en otros macrocomponentes tales como las proteínas.

4.3.1.2 Grado de hidrólisis

Con el objeto de estudiar la cinética de reacción se tomaron alícuotas en diferentes etapas de la digestión simulada y se analizaron en geles electroforéticos. La **Figura RI.16** muestra los perfiles obtenidos en geles de tricina con el aislado de amaranto y el hidrolizado a los diferentes tiempos de digestión gastrointestinal simulada.

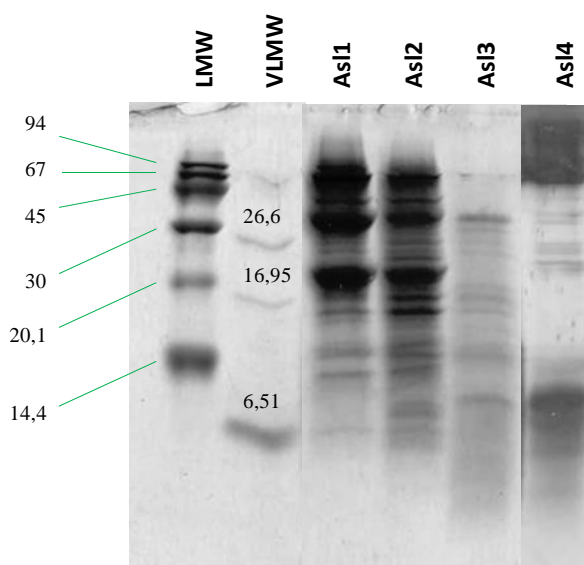


Figura RI.16 Gel electroforético Tricina-SDS-PAGE con 2-ME. Aislado de amaranto (Asl) en distintos momentos de la digestión gastrointestinal simulada: tiempo 0 (**Asl1**), luego de 30 minutos a pH 2 (**Asl2**), luego de 60 minutos con pepsina (**Asl3**) y luego de 60 minutos con pancreatina (**Asl4**). **LWM**: patrones de bajo peso molecular. **VLMW**: patrones de muy bajo peso molecular.

En la calle Asl1 del gel electroforético se observa un perfil similar a los perfiles de aislados proteicos descriptos previamente en el capítulo. Analizando comparativamente las distintas calles sembradas se puede observar que los perfiles van variando a medida que aumenta el tiempo de proteólisis, siendo drásticos los cambios producidos luego de la acción de la pepsina (Asl3) y luego de la acción de la pancreatina (Asl4). Se observa una clara desaparición de las bandas intensas y características de 56 ± 1 y 20 ± 1 kDa y la disminución de la intensidad de la banda de 30 ± 1 kDa junto con otras presentes en la zona superior del gel. Se puede apreciar en estas calles la aparición de nuevas bandas de pesos moleculares inferiores a 14 kDa, las que evidencian la proteólisis producida por la acción de las enzimas digestivas sobre el aislado proteico. La última calle del gel en la que se observa la muestra al final de la digestión gastrointestinal simulada debió

revelarse mediante tinción con plata. A diferencia de las restantes muestras, no fue posible visualizar las bandas con Coomassie Brilliant blue, colorante utilizado en primer lugar por lo que se debió acudir a una metodología más sensible.

Se determinó el grado de hidrólisis (GH%) del aislado hidrolizado por digestión gastrointestinal simulada (Hdr_{DGS}) empleando el ensayo de OPA. El Hdr_{DGS} presentó un GH% de $51,1 \pm 3,8$, valor significativamente superior a aquel obtenido en los hidrolizados cuando se emplearon la proteasa endógena y las enzimas alcalasa+tripsina (Tabla RI.6).

Tabla RI.6 GH% de las muestras obtenidas empleando los tres protocolos de hidrólisis.

	<i>Hdr_E</i>	<i>Hdr_{AT}</i>	<i>Hdr_{DGS}</i>
GH%	$5,3 \pm 0,4^a$	$25,8 \pm 2,2^b$	$51,1 \pm 3,8^c$

Diferentes letras de superíndice corresponden a diferentes valores ($\alpha = 0,05$, LSD).

Estos resultados nos muestran que de ser ingerido, el aislado sufriría una hidrólisis extensiva. En particular durante el desarrollo de este protocolo las proteínas de amaranto mostraron mayor grado de hidrólisis que el informado por Orsini y col. (2011), quienes determinaron que la digestión gastrointestinal simulada realizada de modo similar, produjo un grado de hidrólisis cercano al 40%.

4.3.1.3 Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)

Los cambios sufridos por las proteínas de amaranto como consecuencia de la hidrólisis se analizaron también mediante cromatografía de exclusión molecular. Los cromatogramas obtenidos se observan en la **Figura RI.17**.

La **Tabla RI.7** presenta las áreas porcentuales de cada pico, las masas moleculares de las especies separadas mediante cromatografía de exclusión, el volumen del máximo de absorbancia de cada pico y la suma de las áreas porcentuales en cada una de las zonas. Para identificarlos claramente, éstos se encuentran indicados con números en la Tabla y en la Figura en la que se observan los cromatogramas.

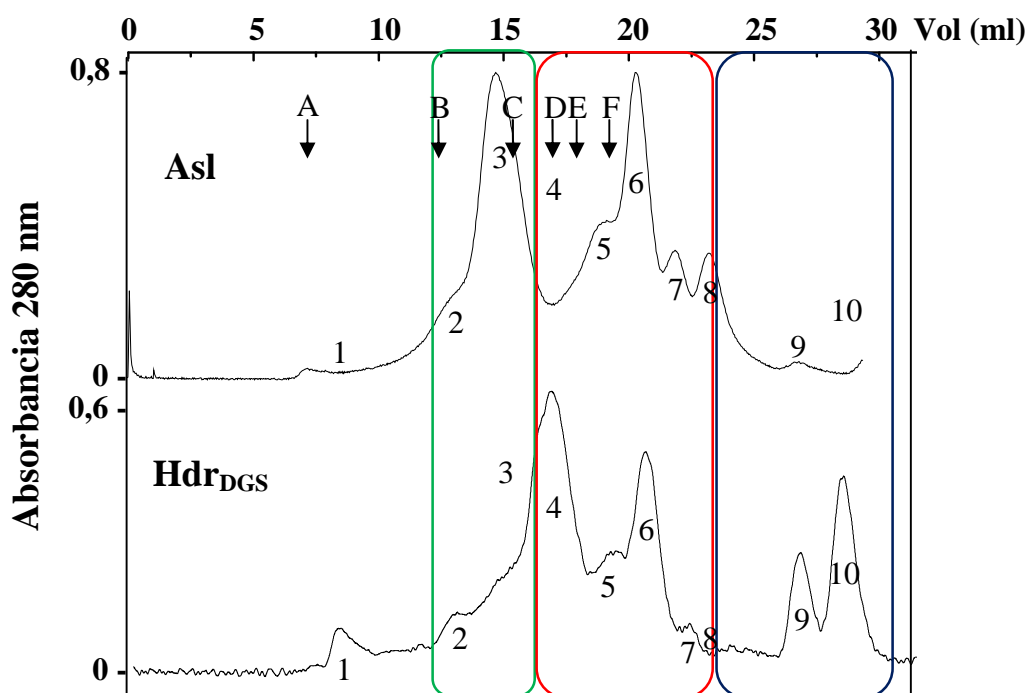


Figura RI.17 Cromatogramas del aislado (**Asl**) e hidrolizado por digestión gastrointestinal simulada (**Hdr_{DGS}**) eluidos con buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,12 mM, pH 7,2. Los recuadros de color indican tres zonas de interés (volúmenes de elución entre 12,5-16,5 ml, **verde**; entre 16,5-23,5 ml, **rojo**; y entre 23,5-27,5 ml, **azul**). La columna se calibró con azul dextrano (**A**), tiroglobulina (**B**), alcohol deshidrogenasa (**C**), albúmina (**D**), ovoalbúmina (**E**), y ribonucleasa (**F**).

Tabla RI.7 Masa molecular (kDa) de las especies separadas en los cromatogramas de exclusión molecular del Asl y Hdr_{DGS}, sus respectivos volúmenes de elución y áreas porcentuales.

	ZONA		verde			roja				azul	
	Pico número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Vol elución (ml)	8,3	13,0	14,5	16,8	19,3	20,5	22,3	23	26,8	28,4
	Masa molecular máximo del pico (kDa)	V _m	500,0	204,8	52,7	12,6	7,9	2,3	1,5	0,3	<0,1
Asl	% Área zona	0,8	42,6			55,4				1,2	
	% Área pico *	0,8	6,3	36,3	-	14,6	22,1	6,8	11,9	1,2	-
Hdr _{DGS}	% Área zona	4,3	6,1			65,8				23,8	
	% Área pico *	4,3	6,1	-	36,3	8,6	15,7	5,2	-	8,6	15,2

* área pico/área total x 100

En el perfil cromatográfico del aislado proteico de amaranto se observa la presencia de agregados (pico 1) y moléculas de gran masa molecular ubicadas en la zona verde, que corresponden a moléculas de globulina P y 11S, y moléculas de globulina 7S.

En la zona roja, se encuentran especies de masa molecular menor a 100 kDa, que corresponderían a la presencia de albúminas, mientras que en la zona azul prácticamente no se detectan especies de baja masa molecular.

El perfil cromatográfico del hidrolizado obtenido por digestión gastrointestinal simulada muestra diferencias respecto al aislado. Este resultado es consistente con el alto grado de hidrólisis que se alcanza durante la digestión simulada, aunque los procesos de disociación asociados al tratamiento a pH 2 que se realiza a la muestra antes y durante la actividad de la pepsina podrían también incidir en la estructura de las proteínas. El pico 1 de los cromatogramas (**Figura RI.17** y **Tabla RI.7**), de alta masa molecular, no se encuentra en los perfiles descriptos previamente para los aislados e hidrolizados en este trabajo. Sin embargo fueron descriptos por Castellani y col. (1998) y Martínez y col. (1997), quienes informaron su presencia y lo adjudicaron a agregados de muy alta masa molecular presentes en el aislado de amaranto. El aumento del área de este pico en el Hdr_{DGS} podría atribuirse a la presencia de mayor cantidad de estos agregados, los que se encontrarían parcialmente insolubles en el aislado; este aumento en la cantidad de agregados solubles podría ocurrir por efecto de la hidrólisis de agregados de mayor masa molecular o tal vez por los cambios de pH a los que se somete la muestra durante la digestión gastrointestinal. Los otros cambios que muestra el cromatograma, asociados a la hidrólisis de la muestra, implican el aumento de las especies proteicas que eluyen en la zona roja junto con la aparición, a volúmenes finales de elución, de dos picos significativamente importantes en los cuales eluyen especies de masa molecular inferior a 1 kDa (zona azul).

4.3.2 Estudio de la actividad antitrombótica *in vitro*

Se determinó la actividad antitrombótica *in vitro* del Asl y Hdr_{DGS} de amaranto. El aislado proteico obtenido no presentó inhibición de la coagulación a las concentraciones estudiadas, tal como fue observado con los otros aislados estudiados. La muestra digerida, Hdr_{DGS}, exhibió una curva de inhibición de la coagulación en función de la concentración de proteínas, mostrando un comportamiento del tipo dosis-respuesta

(Figura RI.18). Como puede observarse en la figura, el hidrolizado presenta actividad inhibitoria a partir de 0,2 mg proteína/ml. A concentraciones más altas, la inhibición aumenta con la concentración hasta alcanzar un *plateau* aproximadamente a 0,8 mg/ml. Los puntos experimentales obtenidos se ajustaron empleando el programa GraphPad Prism 5 para obtener el IC_{50} del hidrolizado, el cual resultó igual a $0,23 \pm 0,02$ mg de proteína/ml.

Este resultado es muy interesante, ya que comprueba la efectividad del tratamiento de digestión para producir péptidos con actividad antitrombótica. Además, al comparar la concentración inhibitoria IC_{50} obtenida para los hidrolizados presentados en este trabajo (Tabla RI.8), se observa que la digestión gastrointestinal permite obtener un producto con mayor potencial inhibitorio que las otras vías hidrolíticas, o lo que es lo mismo, se requiere una concentración mucho menor de Hdr_{DGS} para inhibir el 50% de la coagulación.

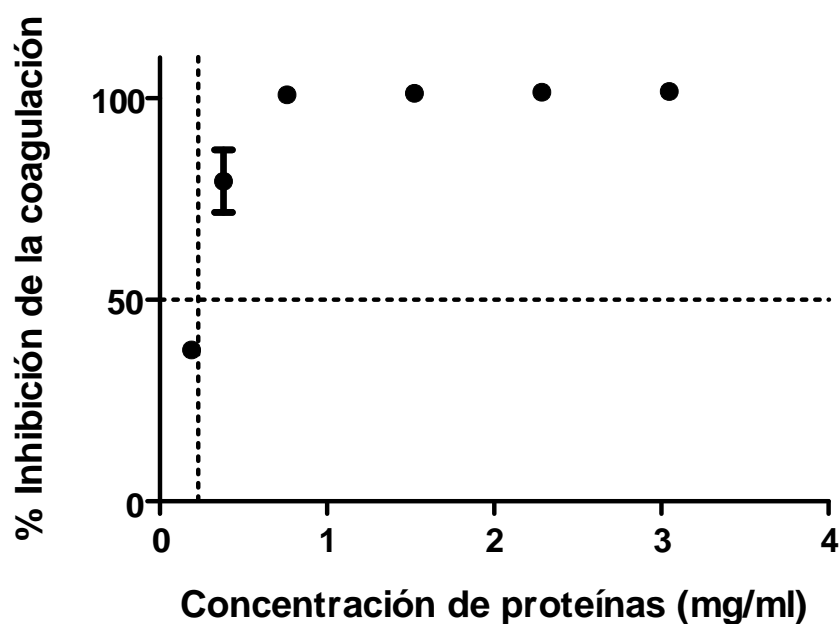


Figura RI.18 Curva de inhibición de la coagulación del hidrolizado por simulación de la digestión gastrointestinal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Es posible que este resultado esté asociado con el alto grado de hidrólisis alcanzado durante la digestión gastrointestinal simulada y por ende, con la presencia de péptidos de tamaño pequeño, aunque no puede descartarse que la mayor actividad se

deba al tipo de péptidos producidos. El hecho de que el Hdr_{DGS} presente un mayor potencial inhibitorio respecto de las otras muestras ensayadas resulta muy promisorio, ya que el aislado podría ser en sí mismo el producto utilizado como ingrediente alimentario biológicamente activo, y el proceso de la digestión, la vía de liberación de los péptidos antitrombóticos que buscamos. Además es interesante observar que esos mismos péptidos liberados resisten la digestión gastrointestinal. Este comportamiento es deseado en péptidos bioactivos (Korhonen y col., 1998; Korhonen y Pihlanto-Leppälä, 2001; Picariello y col., 2010).

Tabla RI.8 Tabla comparativa de los IC₅₀ obtenidos en todas las muestras ensayadas.

<i>Muestras</i>	<i>Aislados</i>	<i>Hdr_E</i>	<i>Hdr_{AT}</i>	<i>Hdr_{DGS}</i>
<i>IC₅₀ (mg/ml)</i>	<i>nd</i>	$5,90 \pm 0,10^b$	$10,90 \pm 0,10^c$	$0,23 \pm 0,02^a$

Diferentes letras de superíndice corresponden a valores diferentes ($\alpha = 0,05$, LSD).

Los datos bibliográficos orientan a pensar que para obtener péptidos bioactivos los hidrolizados deberían presentar grados de hidrólisis superiores al 10% (Benítez y col., 2008). Resulta interesante el hecho de que, aunque el grado de hidrólisis alcanzado con la proteasa endógena es significativamente menor al que se produjo utilizando las enzimas alcalasa+tripsina (**Tabla RI.6**), la actividad inhibitoria de la coagulación de este hidrolizado es significativamente mayor a la detectada en Hdr_{AT} (**Tabla RI.8**). Una posible explicación a este hallazgo podría relacionarse con la especie de amaranto utilizada para estos estudios. Mientras que utilizamos *A. mantegazzianus* para hidrolizar con alcalasa+tripsina, tanto los hidrolizados obtenidos por activación de la proteasa endógena como los sometidos a digestión gastrointestinal simulada, se obtuvieron con harina de semillas de *A. hypochondriacus*. Gorinstein y col. (1991) han informado diferencias existentes en la composición polipeptídica de distintas especies de amaranto. Mientras que en este estudio no hemos observado diferencias importantes en las electroforesis (**Figura RI.1**), sí detectamos diferencias importantes en los perfiles cromatográficos de los aislados que fueron preparados con las dos especies de amaranto (**Figura RI.10 y Figura RI.16**) y en la solubilidad de los mismos.

4.4 Conclusiones del capítulo

El aislado proteico obtenido, ya sea proveniente de *Amaranthus mantegazzianus* o *hypochondriacus*, no produjo inhibición de la coagulación a las concentraciones estudiadas.

Las hidrólisis probadas en este capítulo producen moléculas de baja e intermedia masa molecular, las cuales presentan importantes diferencias estructurales comparándolas con sus proteínas nativas.

Las proteólisis ensayadas condujeron a hidrolizados con diferente grado de hidrólisis, siendo el aislado sometido a la digestión gastrointestinal simulada el que presenta el mayor grado de hidrólisis.

Los tratamientos enzimáticos sobre las proteínas de amaranto generan péptidos con potencial actividad antitrombótica en todos los casos. El aumento de la bioactividad es mucho mayor cuando las enzimas de la digestión gastrointestinal simulada se encuentran involucradas.

Se seleccionó el protocolo de simulación de la digestión gastrointestinal para ahondar en la búsqueda de péptidos con actividad antitrombótica presentes en las proteínas de amaranto.

A decorative graphic featuring three green circles of varying sizes, each with a light gray shadow. The circles are arranged in a triangular pattern. Thin green lines connect the top-left and bottom-left corners of the circles, and another line connects the top-right and bottom-right corners. The text is centered between the top and bottom circles.

RESULTADOS II

DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

5 RESULTADOS II

Hidrolizados proteicos de amaranto obtenidos por digestión gastrointestinal simulada

A la luz de los resultados obtenidos en el capítulo anterior se seleccionó el protocolo de simulación de la digestión gastrointestinal para ahondar en la búsqueda de péptidos con actividad antitrombótica provenientes de las proteínas de amaranto.

5.1. Muestras utilizadas

Los aislados proteicos se prepararon a partir de harina desgrasada de *Amaranthus hypochondriacus* siguiendo el procedimiento antes mencionado en Materiales y métodos (3.1.3).

La composición del aislado proteico y del hidrolizado obtenido por digestión gastrointestinal simulada (Hdr_{DGS}) se describió en el capítulo Resultados I, Tabla RI.5. El grado de hidrólisis de la muestra empleada fue $51,1 \pm 3,8\%$.

5.2 Estudio de la actividad antitrombótica

5.2.1 Actividad antitrombótica *in vitro*

La determinación de la actividad antitrombótica empleando el método de las microplacas se mostró en Resultados I (4.3.2). Brevemente recordemos que el aislado no presentó inhibición de la coagulación a ninguna de las concentraciones analizadas, mientras que el Hdr_{DGS} presentó inhibición de la formación del coágulo y mostró un comportamiento del tipo dosis-respuesta y un valor de IC₅₀ de $0,23 \pm 0,02$ mg/ml. Este resultado indica que el tratamiento de hidrólisis es efectivo para producir péptidos con actividad antitrombótica, y muestra que la digestión gastrointestinal puede ser una herramienta generadora de péptidos o polipéptidos capaces de ejercer inhibición de la coagulación.

5.2.2 Actividad antitrombótica *in vivo* y *ex vivo*

La producción de péptidos o polipéptidos bioactivos de amaranto a través de la digestión gastrointestinal simulada nos impulsó a elegir este camino para realizar

estudios de mayor complejidad con animales. Si estos resultados, hallados *in vitro*, se repitieran *in vivo*, y dado que los péptidos que potencialmente inhiben la coagulación se liberarían durante la digestión y resistirían a la misma, utilizando aislado de amaranto como fuente proteica en la dieta diaria de los animales podríamos detectar la efectividad para manifestar su actividad antitrombótica en el modelo animal.

Para probar la actividad en animales se planificaron ensayos *in vivo* y *ex vivo*. Estos ensayos se encuentran detallados en Materiales y métodos 3.3.2. Brevemente, los animales fueron alimentados en forma controlada con las dietas detalladas en la sección mencionada.

Se utilizaron 22 ratas Wistar macho de entre 11 y 12 semanas de edad al inicio del ensayo, las cuales se distribuyeron en 3 grupos, conformados por 7 u 8 ratas cada uno. Los animales fueron pesados individualmente para separarlos en los grupos de modo de obtener homogeneidad entre ellos. Los grupos se denominaron C, H y A. El grupo C (Control), integrado por 7 ratas, fue alimentado con la dieta básica o control durante 2 semanas hasta su sacrificio, de la misma forma que el grupo H (Heparina), conformado por 7 ratas. Los animales del grupo H recibieron una inyección intraperitoneal de heparina, anticoagulante de gran potencia, antes de la extracción de la sangre. El grupo A (Amaranto), integrado por 8 ratas, fue alimentado con la dieta que contiene amaranto durante las 2 semanas previas a su sacrificio.

A cada grupo se le proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Las dietas se formularon de acuerdo a Reeves y col. (1993). La formulación de la dieta AIN 93 asegura el aporte de macro y micronutrientes que permite que los animales estén bien alimentados. La dieta que contiene amaranto se obtuvo realizando un reemplazo parcial de la fuente proteica de la dieta básica por aislado proteico obtenido en nuestro laboratorio. La proteína de amaranto reemplazó aproximadamente la mitad de la caseína, ~56%, que es la proteína de la dieta básica. Como el aislado contiene un porcentaje de proteínas cercano al 75%, se ajustó el aporte de los otros macrocomponentes teniendo en cuenta su composición centesimal.

Durante el ensayo se determinó diariamente el peso del alimento consumido, mientras que cada animal fue pesado semanalmente. En la **Figura RII.1** se puede observar el consumo promedio de dieta a través de todo el ensayo por grupo, expresado como gramo de alimento consumido por rata, por día. En los tres casos se puede observar que el valor medio se encuentra entre 15 y 20 g. Estos valores coinciden con los informados por otros autores que utilizan ratas en sus experiencias (Krinke, 2000; Kalyani y col., 2012). El grupo H consumió un promedio de $17,2 \pm 1,2$ g dieta/rata.día, el grupo C $18,7 \pm 2,2$ g dieta/rata.día, mientras que el grupo A ingirió $18,3 \pm 3,1$ g dieta/rata.día. Las medias encontradas no presentaron diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0,05$).

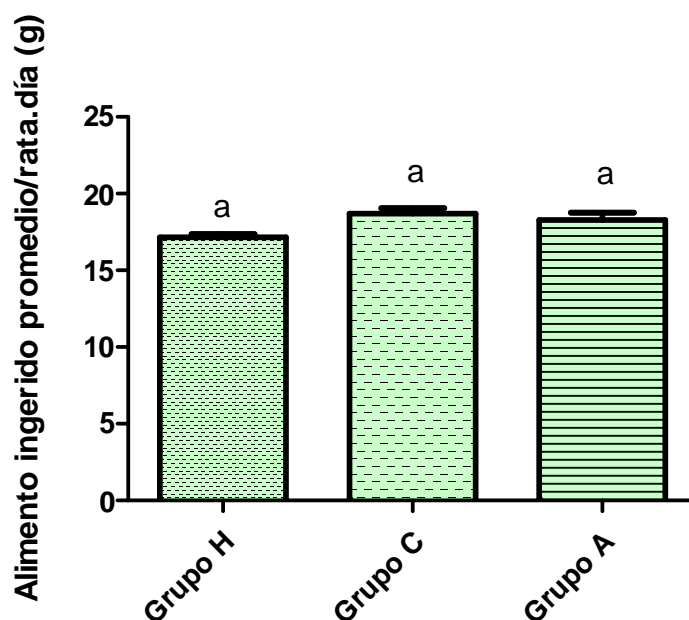


Figura RII.1 Consumo de dieta promedio por grupo. Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa ($\alpha = 0,05$, Tukey).

Como mencionamos antes, cada animal fue pesado una vez a la semana. En la **Figura RII.2** cada barra representa el peso promedio de los animales de un grupo a un tiempo determinado. Se puede observar un leve aumento de peso en todos los grupos estudiados. Aun así los tres grupos mantuvieron su peso promedio entre 300 y 400 g. Este peso coincide con los datos aportados por Cossio-Bolaños y col. (2013), quienes evaluaron curvas de crecimiento de ratas macho Wistar. Estos autores encontraron que entre las semanas 11 y 13 de edad, los pesos varían entre 350 y 380 g aproximadamente.

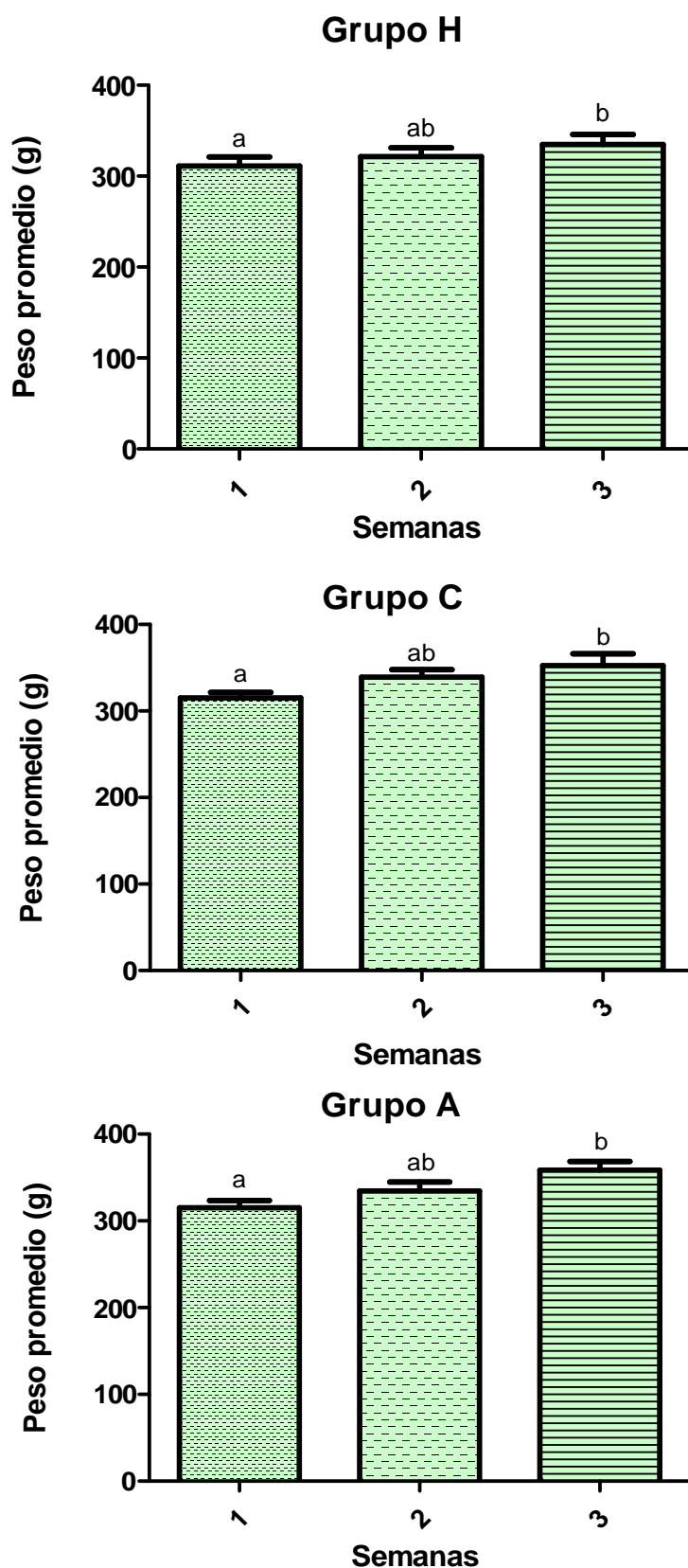


Figura RII.2 Peso promedio de los animales en el grupo heparina (grupo H), control (grupo C) y amaranto (grupo A) al momento de iniciar el ensayo (1), a la semana (2) y en el día del sacrificio (3). Las barras de error corresponden al error estándar de la media. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa ($\alpha = 0,05$, Tukey).

El aumento de peso promedio de los animales entre las semanas inicial y final fue significativo en todos los casos (Tukey, $\alpha = 0,05$), denotando un leve crecimiento en los animales que debería continuar hasta la semana 15 (Cossio-Bolaños y col., 2013).

Una vez transcurrido el tiempo de alimentación controlada, cada animal fue anestesiado, administrando dosis adecuadas de pentobarbital sódico y diazepam (Materiales y métodos 3.3.2.2). Los animales pertenecientes al grupo H, recibieron además la dosis intraperitoneal de 250 UI de heparina.

5.2.2.1 *Determinación de la actividad antitrombótica in vivo*

Tiempo de sangría

El tiempo de sangría es un ensayo clínico ampliamente utilizado para reconocer o medir la actividad plaquetaria (Day y col., 2004). Se basa en la determinación del tiempo necesario para que cese el sangrado de una pequeña herida provocada adrede. Este parámetro se ve prolongado en casos de deficiencia o inhibición de las plaquetas, de alteraciones en la adhesión a la pared del vaso sanguíneo y/o de alteraciones en la agregación que conduce a la formación del tapón plaquetario (Lavalley y MacLombair, 1998), todos ellos fenómenos que forman parte de la hemostasia primaria.

En este trabajo se realizó el ensayo de la transección de la cola (Materiales y métodos 3.3.2.3.1), que consiste en realizar una incisión perpendicular al eje de la cola en la punta, mientras el animal se encuentra bajo el efecto de la anestesia. El sangrado en función del tiempo se registró por contacto de la zona de la incisión con una tira de papel de filtro cada 30 segundos. Se consideró como tiempo de sangría al necesario para que cese completamente el sangrado, y se determinó en el momento que no se observó marca alguna en el papel de filtro (Stengberg y col., 1998; Nieswansdt y col., 2001; Grüner y col., 2004). Por el modo en que se realizó la determinación, los tiempos de sangría obtenidos serán múltiplos de 30 segundos y no se registraron diferencias menores a ese lapso.

La **Figura RII.3** muestra, a modo de ejemplo, el tiempo de sangría de un animal perteneciente a cada grupo en estudio. El animal del grupo H, es decir el que recibió la

dosis de heparina, presentó el máximo tiempo de sangría, 7 minutos, seguido por el tiempo registrado para el animal del grupo A, alimentado con amaranto en la dieta (5,30 minutos). El animal del grupo C, presentó un tiempo de sangría de 3,30 minutos. Este resultado, mostrado en la **Figura RII.3** como ejemplo, se tradujo en la tendencia observada a lo largo de todas las determinaciones realizadas y puede apreciarse con más claridad en la **Figura RII.4**, en la que se muestra el tiempo de sangría promedio obtenido para cada grupo.

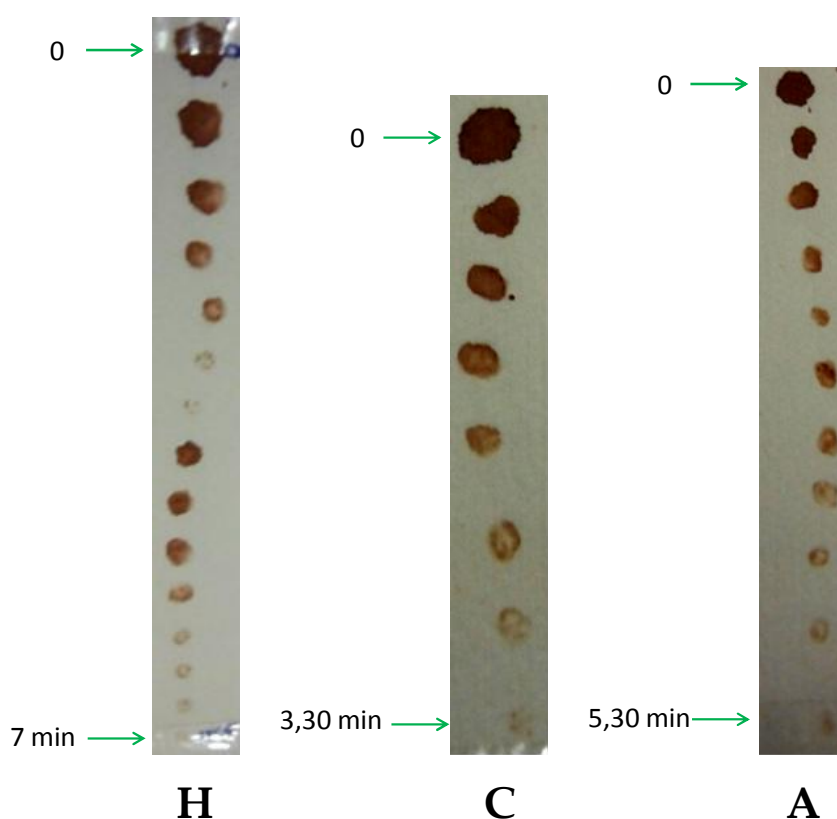


Figura RII.3 Tiempo de sangría obtenido para un animal del grupo heparina (H), grupo control (C) y grupo amaranto (A).

El tiempo de sangría hallado fue $360,0 \pm 24,5$ segundos para el grupo heparina, de $230,0 \pm 10,0$ segundos para el grupo control y de $270 \pm 21,7$ segundos para el grupo amaranto. Si bien el tiempo de sangría del grupo H presentó diferencias significativas respecto a los obtenidos para los otros dos grupos, no hubo diferencia significativa entre los grupos C y A (Tukey, $\alpha = 0,05$).

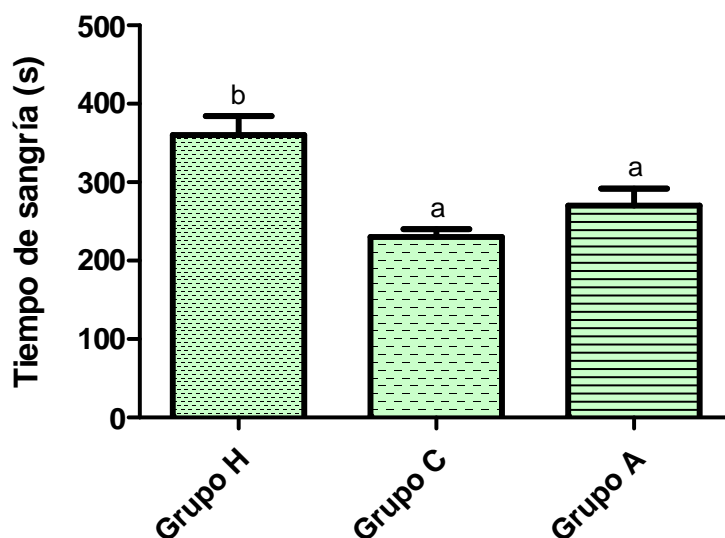


Figura RII.4 Tiempo de sangría promedio del grupo heparina (Grupo H), grupo control (Grupo C) y grupo amaranto (Grupo A). Las barras de error corresponden al error estándar de la media. $n = 5-7$ en cada grupo en estudio. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa ($\alpha = 0,05$, Tukey).

Lavelle y MacIombair (1998) midieron el tiempo de sangría en ratas. Estos autores obtuvieron tiempos de sangría de $340,9 \pm 25,7$ segundos para el grupo de ratas control y $551,0 \pm 31,8$ segundos para ratas que fueron inyectadas con heparina (200UI/kg rata). Ambos valores resultaron ser más altos que los detectados en nuestro trabajo. La diferencia puede deberse tanto al planteo experimental, ya que estos autores trabajaron con ratas Sprague Dawley hembras y machos, como a las condiciones utilizadas para la determinación del tiempo de sangría. Sin embargo en ambos estudios se observó que la heparina produce un aumento del tiempo de sangría, tal como se mencionó con anterioridad. La heparina es un anticoagulante que inhibe fuertemente a la enzima trombina, mientras que tal como hemos mencionado, el tiempo de sangría se relaciona directamente con la función plaquetaria. Liu y col. (2012) encontraron tiempos de sangría entre 120 y 180 segundos para un grupo control de ratas, y valores de entre 400 y 1200 segundos en ratas tratadas con diferentes dosis de una droga antiplaquetaria denominada Prasugrel, administrada a través de una sonda esofágica. En este caso la mayor prolongación del tiempo de sangría puede deberse a que está alterada justamente la función plaquetaria, por acción directa de la droga antiagregante. Por lo tanto, los

tiempos de sangría de las ratas con Prasugrel informados por Liu y col. (2010) no son comparables con los que hemos determinado en este trabajo.

Los resultados que encontramos, así como los informados por Lavelle y MacLombair (1998), nos indican una mayor inhibición de la agregación plaquetaria por parte de los animales que se encuentran heparinizados. Varios trabajos han confirmado el hecho de que la heparina, aunque reconocida por su efecto inhibitorio en las reacciones que conducen a la coagulación de la sangre, genera prolongaciones en el tiempo de sangría (Borghgrevink, 1961; Lavelle y MacLombair, 1998; Kitazato y col., 2003). En 1990 fue descubierto un receptor en las plaquetas activado por proteasas (PAR)-1 (Vu y col., 1991; Rasmussen y col., 1991). Este hallazgo inició una ardua búsqueda para comprender de qué manera se relacionaban la trombina y las plaquetas. Diez años más tarde se pudo concluir que la trombina juega un rol esencial en la activación de las plaquetas. Cuando se agrega la enzima a plaquetas humanas *in vitro*, ocurren cambios en su forma, se apilan unas contra otras y secretan los contenidos de sus gránulos de reserva (Brass, 2003). Se podría asociar, entonces, la presencia de la heparina (inhibidor de la enzima trombina) a una inhibición de la agregación plaquetaria y, por ende, a una prolongación en el tiempo de sangría.

Existen diferentes métodos para determinar el tiempo de sangría en ratas, y se encuentra ampliamente estudiado que los valores absolutos obtenidos difieren según sea el método aplicado (Dejana y col., 1982; Lavelle y MacLombair, 1998; Greene y col., 2010). El método de la transección de la punta de la cola de las ratas, no puede emplearse como *screening* de drogas que actúan sobre la función plaquetaria dado que es sensible a los defectos de la coagulación (Dejana y col., 1982). El hecho de que los factores de la coagulación incidan en nuestro caso sobre el tiempo de sangría se relaciona con el hecho de que el corte efectuado sobre la punta de la cola es una incisión en una arteriola y no en un capilar. La arteriola, a diferencia del capilar, se encuentra recubierta por una capa de músculo liso que puede provocar un leve efecto de vasoconstricción (Rinaldi y Bohr, 1989; Rinaldi, 1990). La vasoconstricción podría ocasionar una ligera acumulación de sangre previa a su salida por la arteriola, y por consiguiente, pondría en juego la

hemostasia secundaria o coagulación propiamente dicha sobre las medidas realizadas. Se entiende, por ende, que en nuestras determinaciones no estaríamos evaluando netamente la inhibición de la agregación plaquetaria, sino que si existiera efecto inhibitorio de la coagulación lo detectaríamos como un aumento en el tiempo de sangría. Ello explicaría, junto al efecto de inhibición de la activación plaquetaria, la clara diferencia encontrada en el tiempo de sangría del grupo H comparado con los otros dos grupos en estudio.

Si bien no hallamos diferencias significativas en el tiempo de sangría de los animales alimentados con amaranto respecto a los que no recibieron amaranto en sus dietas, los resultados muestran una tendencia marcada, que tal vez se podría comprobar aumentando el número de animales o modificando las condiciones de ensayo, aumento del contenido de proteína de amaranto en la dieta.

5.2.2.2 Determinación de la actividad antitrombótica *ex vivo*

5.2.2.2.1 Ensayos realizados con el hemostatómetro

El hemostatómetro permite estudiar un modelo de coagulación intrínseca tal como se describe en Materiales y métodos (3.3.2.3.2). Detalles del equipo se han descrito en una gran cantidad de trabajos (Gorog y Kovacs, 1990; Yamamoto y col., 1999; Taka y col., 2000; Yamada y col., 2004; Satake y col., 2007; Shimizu y col., 2009). A partir de estas descripciones hemos construido un hemostatómetro que utilizamos en este trabajo de Tesis (**Figura RII.5**). Las determinaciones se realizaron con la sangre de las ratas.

Brevemente, una vez finalizado el período de alimentación, los animales fueron anestesiados tal como mencionamos para determinar el tiempo de sangría. Luego de determinado este parámetro, los animales se conectaron a un respirador y se realizó una incisión en la zona abdominal a fin de encontrar la aorta abdominal. Una vez localizada la arteria, se colocó en ella una cánula desde la que se extrajo la sangre. La sangre extraída de la aorta abdominal de la rata, sin agregado de anticoagulantes, se perfundió a través de un tubo de polietileno empujándola por acción de una bomba. A los 90

segundos de la extracción se perforó el tubo, simulando la injuria de un vaso, y se estudió el comportamiento de la sangre al desencadenarse la coagulación de la misma. El proceso se estudió mediante el monitoreo de los cambios de presión en el equipo, los cuales se pueden asociar a dos parámetros: la formación del tapón plaquetario y la coagulación de la sangre propiamente dicha, o hemostasia primaria y secundaria, respectivamente.

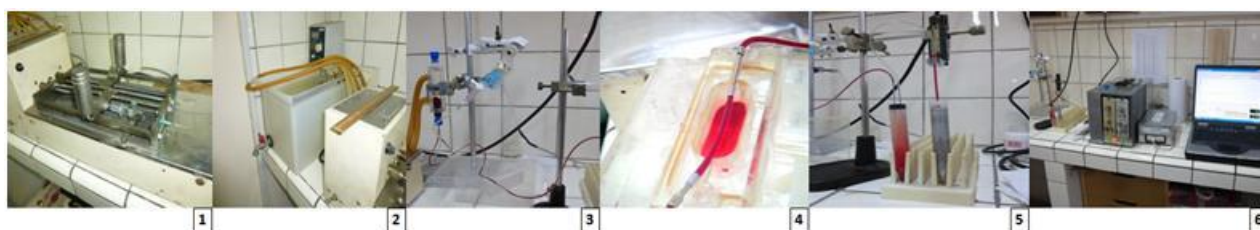


Figura RII.5 Imágenes del hemostatómetro. 1 Bomba Harvard. 2 Baño termostático. 3 Cámara termostatzada con sangre en su interior y transductor de presión. 4 Tubo perforado, conexiones y cámara con solución salina termostatzada. 5. Tubo de lavado y tubo de mercurio con tornillo micro. 6 Analizador y registrador de la presión.

Cuando el ensayo se inició la presión registrada, que se debe al flujo, se mantuvo constante e igual a 60 mm Hg. Cuando se perforó el tubo de polietileno, 90 segundos después de la extracción de la sangre, la presión cayó abruptamente ya que el orificio que se realizó permite la salida del fluido. En ese momento comienzan los fenómenos tendientes a ocluir la perforación del tubo por agregación plaquetaria y coagulación de la sangre. La recuperación de la presión hasta los valores que el sistema tenía inicialmente (60 mm Hg) se asocia a la formación del tapón plaquetario, mientras que el momento en el que la presión alcanza los 100 mm Hg y diverge hacia valores mayores se corresponde con el momento en que la sangre deja de fluir a través del tubo a causa de la oclusión completa del mismo, y se relaciona con la coagulación.

Con cada animal se obtuvo un registro de presión en función del tiempo, que se denomina hemostatograma. De cada hemostatograma se obtuvieron dos tiempos: tiempo de formación del tapón plaquetario y tiempo de coagulación total. También se midieron las áreas correspondientes al proceso de agregación plaquetaria con el objeto de analizar comparativamente la formación del tapón. En la **Figura RII.6** se presentan, a

modo de ejemplo, hemostatogramas obtenidos por perfusión de la sangre de animales pertenecientes a los grupos, H, C y A.

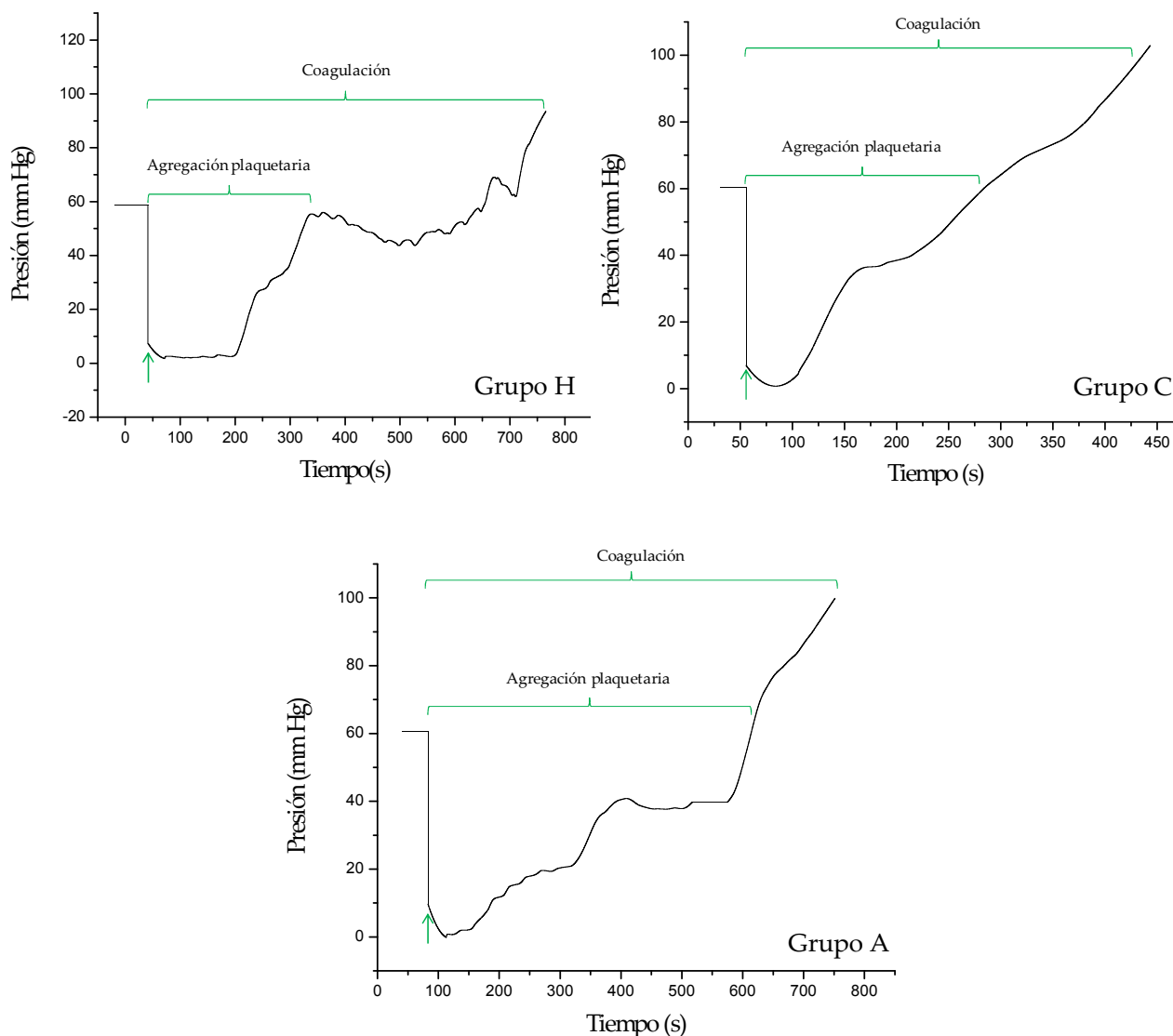


Figura RII.5 Hemostatogramas del grupo heparina (H), grupo control (C) y grupo amaranto (A). La flecha verde indica el momento de la perforación del tubo de polietileno del equipo.

Los hemostatogramas presentados en la **Figura RII.6** son representativos de los respectivos grupos. En la Figura se indican los tiempos de perforación del tubo, mediante una flecha verde, los tiempos de recuperación de la presión, asociados a la agregación plaquetaria y los tiempos requeridos para aumentar la presión a 100 mm Hg, relacionados con la coagulación total.

En el hemostatograma obtenido con la sangre de la rata alimentada con la dieta básica (**Figura RII.6**, Control) se registró el menor tiempo de formación del tapón

plaquetario (tiempo de recuperación de la presión). El tiempo de recuperación de la presión obtenido con la sangre de los animales del grupo H fue mayor que el registrado para el grupo C, mientras que el del grupo A fue el más prolongado. Respecto al tiempo de coagulación, nuevamente el grupo control fue el que mostró el menor tiempo, luego el grupo amaranto y el mayor, correspondió al grupo heparina. Los resultados promedio de los tiempos obtenidos con la sangre de los animales de los grupos H, C y A se muestran en las **Figuras RII.7, RII.8 y RII.9**, donde se presentan los parámetros tiempo de recuperación, área de recuperación y tiempo de coagulación de cada grupo de animales en estudio.

I. Tiempo de recuperación y área de recuperación

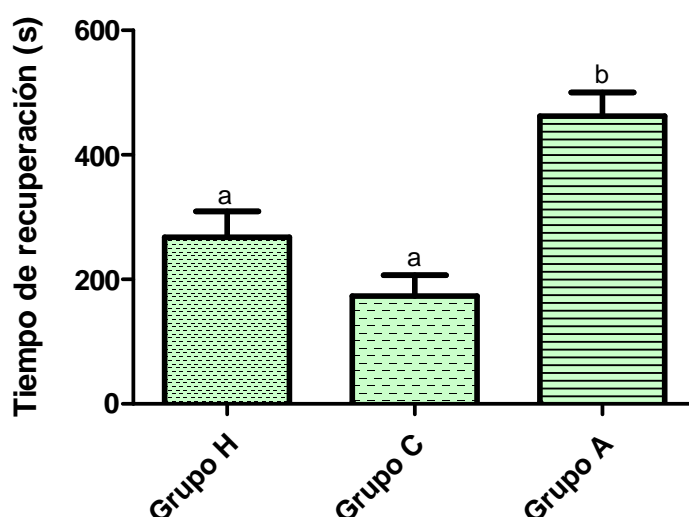


Figura RII.7 Tiempo de recuperación de la presión obtenidos para los grupos heparina (H), control (C) y amaranto (A). Las barras de error corresponden al error estándar de la media. $n = 5-7$ en cada grupo en estudio. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa ($\alpha = 0,05$, Tukey).

Tal como describimos antes para los hemostatogramas que se muestran como ejemplo, la **Figura RII.7** nos permite observar que el grupo amaranto presentó el tiempo de recuperación más prolongado ($462,2 \pm 38,2$), significativamente diferente al tiempo de recuperación del grupo control y del grupo heparina (Tukey, $\alpha = 0,05$). Estos resultados difieren de los obtenidos para el tiempo de sangría, parámetro que resultó mayor para el grupo heparina. Tal diferencia puede adjudicarse al hecho de que en el hemostatómetro no hay contribución de la vasoconstricción, mientras sí está presente al determinar el

tiempo de sangría por transección de la cola de las ratas, determinación *in vivo*, que necesariamente involucra el efecto de la capa de músculo liso que posee la arteria de la cola (Dejana y col., 1982).

Los resultados obtenidos no nos permitieron observar diferencias significativas entre el grupo H y el grupo C, $267,2 \pm 41,4$ y $173,0 \pm 33,5$ respectivamente, evaluado estadísticamente mediante el método de Tukey ($\alpha = 0,05$). Sin embargo se observa una tendencia que indicaría que la heparina incide sobre la agregación plaquetaria tal como se describió anteriormente.

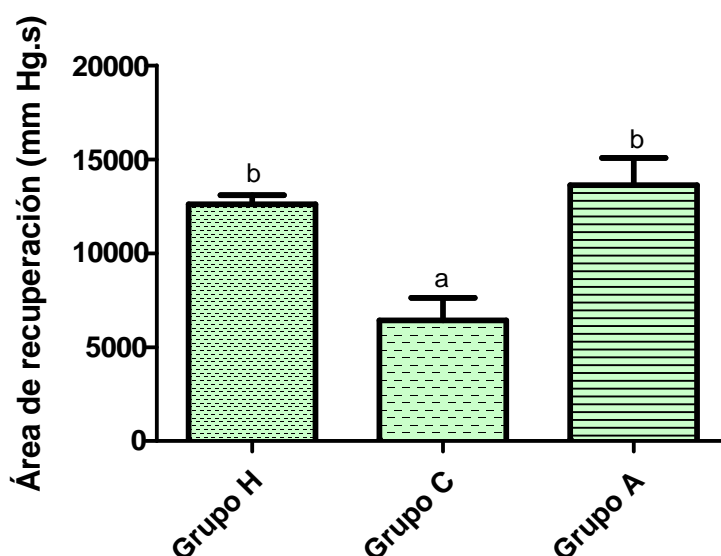


Figura RII.8 Área de recuperación de la presión obtenida para los grupos heparina (H), control (C) y amaranto (A). Las barras de error corresponden al error estándar de la media. $n = 5-7$ en cada grupo en estudio. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa ($\alpha = 0,05$, Tukey).

El área de recuperación de la presión es un parámetro que permite junto al tiempo de recuperación, evaluar la formación del tapón plaquetario. Indica de algún modo la pendiente de recuperación de la presión obtenida en los hemostatogramas y no sólo el tiempo que tarda en formarse el tapón. Si analizamos comparativamente las **Figuras RII.7 y RII.8**, podemos observar la misma tendencia entre los grupos: las barras que indican los parámetros correspondientes al grupo A son las más altas, las que corresponden al grupo H intermedias y las que representan al grupo C, las más pequeñas. Sin embargo, el área de recuperación promedio determinada para el grupo H no resultó significativamente diferente a la del grupo A (Tukey, $\alpha = 0,05$), mientras que sí

se había observado diferencia entre ambos grupos en el tiempo de recuperación. Por otra parte, el área de recuperación promedio del grupo control, presentó diferencias significativas con las obtenidas para los grupos amaranto y heparina.

El área de recuperación de la presión obtenida a partir de los hemostatogramas ha sido informada por otros autores. Shimizu y col. (2009) obtuvieron áreas de recuperación cuyos valores se encontraron entre 5000 y 7000 mm Hg.segundo para la sangre de rata control, y valores entre 10000 a 12000 mm Hg.segundo al determinar el área de recuperación de la presión perfundiendo la sangre previamente mezclada con hidrolizado proteico de músculo de cerdo. En otro estudio Yamamoto y col. (2003) informaron áreas de recuperación de la presión de 7500 a 10000 mm Hg.segundo utilizando sangre de rata control, y otros entre 15000 y 45000 mm Hg.segundo para sangre mezclada con distintos extractos obtenidos a partir de variedades diferentes de tomate en una relación 9:1 sangre:extracto. En su trabajo sobre extractos de centella asiática, Satake y col. (2007) informaron áreas de recuperación cercanas a 5000 mm Hg.segundo al estudiar sangre de rata control y valores no superiores a los 7500 mm Hg.segundo al analizar la sangre de animales que recibieron los extractos de centella purificados. En el trabajo de Satake y col. (2007) se administraban los extractos a través de un tubo gástrico por vía oral en dosis entre 15 y 45 mg/kg rata, 2 veces al día durante 2 semanas. En el ensayo llevado a cabo en este trabajo de Tesis obtuvimos áreas de recuperación de la presión comparables con las informadas en la bibliografía para la sangre de rata control (6422 ± 1208 mm Hg.segundo) y para la sangre de las ratas alimentadas con el aislado proteico de amaranto, grupo para el que obtuvimos 13618 ± 1454 mm Hg.segundo. Nuestros resultados son interesantes ya que debe tenerse en consideración, que la muestra que es bioactiva fue incorporada en la dieta de los animales (9% p/p), los animales la ingirieron, sufrió la digestión gastrointestinal en las ratas y debió absorberse a nivel intestinal para que hayamos podido visualizar su efecto en el comportamiento de la sangre extraída. Se encuentran, entonces, valores comparables con aquellos enunciados por diversos autores, e incluso más prometedores teniendo en cuenta la manera en que se administró el aislado proteico de amaranto.

II. Tiempo de coagulación

El tiempo de coagulación se encuentra asociado a la última fase de la hemostasia donde se busca obtener monómeros de fibrina a partir del fibrinógeno por acción de la enzima trombina para lograr la coagulación total de la sangre. En la **Figura RII.9** se presentan los tiempos de coagulación promedio obtenidos de los hemostatogramas de los tres grupos en estudio. Se puede apreciar que el grupo H presentó los mayores tiempos de coagulación ($828,5 \pm 46,8$ segundos), resultado esperable, ya que la heparina es un anticoagulante ampliamente empleado que inhibe a la enzima trombina, principal involucrada en esta etapa de la hemostasia. El grupo amaranto alcanzó un tiempo de coagulación de $612,1 \pm 32,4$ segundos, mientras que en el grupo control se encontró el valor más bajo, $330,9 \pm 49,5$ segundos. Los tres grupos presentaron valores de tiempo de coagulación significativamente distintos según indicó el análisis estadístico de los resultados (Tukey, $\alpha = 0,05$).

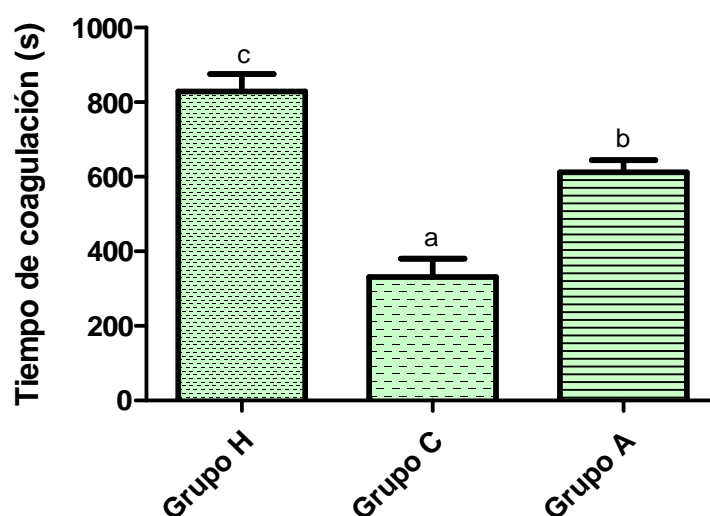


Figura RII.9 Tiempo de coagulación obtenidos para los grupos heparina (H), control (C) y amaranto (A). Las barras de error corresponden al error estándar de la media. $n = 5-7$ en cada grupo en estudio. Diferentes letras sobre las barras indican diferencia significativa ($\alpha = 0,05$, Tukey).

Los tiempos de coagulación hallados en este estudio resultaron comparables con los obtenidos por Satake y col. (2007), quienes informaron valores de ~ 500 segundos para el grupo de animales control, y entre 600 y 750 segundos para la sangre de las ratas que recibieron oralmente las dos fracciones más activas de la centella asiática. En los

trabajos de Shimizu y col. (2009) y Yamamoto y col. (2003) en cambio, no se informan diferencias significativas entre los tiempos de coagulación de la sangre mezclada con las muestras y la sangre control.

5.2.2.2.2 *Ensayos clínicos de coagulación. Pruebas globales de la hemostasia*

Tal como hemos expresado anteriormente, las pruebas globales de la hemostasia proveen resultados que indican la existencia de algún tipo de alteración en los componentes plasmáticos del sistema hemostático. Son pruebas de *screening* que no permiten identificar los factores implicados en ella, pero son rápidas y simples de analizar. Entre ellas, el tiempo de trombina (TT) permite estudiar la etapa de fibrinoformación al medir el tiempo que tarda en coagular el plasma citratado en presencia de la enzima trombina; el tiempo de protrombina (TP) detecta alteraciones de los factores pertenecientes a la vía extrínseca al medir el tiempo de coagulación de un plasma citratado en presencia de tromboplastina y Ca^{+2} ; el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) detecta alteraciones en los componentes de la vía intrínseca y consiste en la medición del tiempo de coagulación de un plasma citratado en presencia de componentes fosfolipídicos de la tromboplastina (tromboplastina parcial), un activador y iones calcio.

Para estos ensayos se utilizó la sangre de las ratas inmediatamente después de ser extraída a través de la cánula colocada en la arteria aorta abdominal (Materiales y métodos, 3.3.2.2). La mayor parte de la sangre se utilizó en los ensayos previamente descritos para obtener los hemostatogramas, y con una porción de la misma se obtuvo el plasma. Para eso se colocó la sangre en un tubo conteniendo citrato como anticoagulante (relación sangre:citrato 9:1), se centrifugó a 2500g durante 15 minutos a temperatura ambiente, se separó el plasma, y se congeló a -20°C hasta su uso. Con el plasma de cada animal se realizaron las tres pruebas globales de la hemostasia, TT, TP y APTT, al menos por duplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla RII.1**.

Tabla RII.1 Tiempo de Protrombina (PT), Tiempo de Trombina (TT) y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) determinados en el plasma obtenido con la sangre de los animales.

	<i>TP (s)</i>	<i>TT (s)</i>	<i>APTT(s)</i>
<i>Grupo H</i>	$36,3 \pm 11,0^b$	$> 600^c$	$89,8 \pm 8,0^c$
<i>Grupo C</i>	$20,6 \pm 2,3^a$	$96,4 \pm 4,3^a$	$43,3 \pm 2,9^a$
<i>Grupo A</i>	$22,6 \pm 2,0^a$	$113,1 \pm 5,6^b$	$49,4 \pm 6,0^b$

Diferentes letras en superíndice en la misma columna indica valores que presentan diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0,05$).

Los ensayos fueron realizados con los kits comerciales de Wiener lab. Los valores considerados normales al analizar plasma humano y que son los esperados según indican los proveedores, son 10 a 14 segundos para el tiempo de protrombina, 17 a 21 segundos para el tiempo de trombina y 33 a 48 segundos para el tiempo de tromboplastina parcial activada. Cuando se utilizó el plasma de los animales del grupo control (C) los resultados obtenidos difirieron de los especificados para humanos tanto para el TT como para el TP. Esta discordancia ha sido informada por otros autores. García-Manzano y col. (2001) realizaron estudios comparativos de ensayos de coagulación con plasma humano y plasma de ratas macho Wistar, y encontraron que el modelo de ratas es un modelo aceptable aunque los valores no coinciden estrictamente.

El modelo animal de ratas ha sido ampliamente empleado en los últimos años para estudiar parámetros relacionados con la coagulación. Algunos ejemplos son los trabajos de Palm y col., (1997), Prezoto y col. (2002), Cho y Choi (2003), You y col. (2004), y los más recientes de Lemini y col. (2012) y Huang y col. (2014). Al analizar los resultados que se informan en estos trabajos, se observa que los valores de tiempos TT, TP y APTT obtenidos con el plasma de ratas control son muy variables. Huang y col. (2004) hallaron valores de TP control de ~10 segundos, APTT control de ~18 segundos y TT control de ~75 segundos, mientras que Palm y col. (1997) obtuvieron valores de 15 a 20 segundos, 25 a 45 segundos y 20 a 30 segundos para los tiempos de protrombina, tromboplastina parcial activada y trombina, respectivamente. Por otra parte, García-Manzano y col. (2001) hallaron para plasma de ratas control, tiempos de 25 a 30 segundos, 13 a 19 segundos y 28 a 36 segundos para TP, APTT y TT respectivamente. Los valores de TP, APTT y TT obtenidos en nuestro estudio con el plasma de las ratas del

grupo C fueron $20,6 \pm 2,3$, $43,3 \pm 2,9$ y $96,4 \pm 4,3$ respectivamente (**Tabla RII.1**). Si comparamos estos valores con los hallados en la bibliografía puede apreciarse que el tiempo de trombina obtenido en nuestro ensayo resultó superior a los informados. Aun así, la gran variabilidad de los valores encontrados en los tiempos control de las pruebas globales de la hemostasia en los distintos trabajos consultados nos permite avalar a los resultados obtenidos en este ensayo.

Al analizar la **Tabla RII.1** se puede apreciar que el TT aumenta significativamente en los animales del grupo heparina (Tukey, $\alpha = 0,05$), lo cual es esperable dado que la heparina inhibe específicamente a la enzima trombina. Este resultado concuerda con lo descrito en el trabajo de Prezoto y col. (2002) quienes informaron un aumento en el TT al analizar el plasma de ratas inyectadas con 300UI de heparina por kilogramo de peso. También se observa un aumento del TT en el plasma de los animales del grupo amaranto (Tukey, $\alpha = 0,05$), aunque en menor medida que el hallado con las ratas del grupo H. El tiempo de trombina de los animales del grupo A aumentó 17% respecto al TT de los animales del grupo control. Este aumento fue superior al informado por You y col. (2004), quienes estudiaron los efectos de la enzima batroxobina, proveniente del veneno de *Bothrops atrox moojeni*, sobre la coagulación de las ratas, adicionándola directamente sobre el plasma de los animales. Cho y Choi (2014) encontraron que una proteasa proveniente de la planta *Spirodela polyrhiza* fue capaz de duplicar el tiempo de trombina respecto al obtenido con animales control cuando inyectaron la enzima purificada en la vena femoral de las ratas (0,05 mg/kg rata). Si bien estos autores encontraron un aumento mucho mayor del TT que el registrado en nuestro estudio, la administración de la sustancia bioactiva es mucho más directa que la forma en la que el amaranto fue suministrado.

Los APTTs determinados en plasma de animales de los grupos heparina y amaranto presentaron diferencias significativas al compararlos entre sí y con los obtenidos con el plasma de las ratas control (Tukey, $\alpha = 0,05$). Los valores de APTT obtenidos con los animales del grupo H concuerdan con los datos informados por Prezoto y col. (2002). En nuestro estudio APTT aumentó 14% respecto al control, y

aunque fue un aumento significativo, resulta levemente inferior a los valores hallados por Cho y Choi (2014) quienes informaron que el tiempo de tromboplastina parcial activada se duplicó y hasta se triplicó en los animales que recibieron la inyección de la proteasa de *Spirodela polyrhiza*.

El TP obtenido con el plasma de los animales alimentados con amaranto, Grupo A **Tabla RII.1**, no mostró diferencia significativa (Tukey, $\alpha = 0,05$) al compararlo con el determinado con el grupo control, mientras que el TP de las ratas del grupo heparina resultó significativamente diferente a los de los otros dos grupos. Este resultado coincide con el encontrado por Prezoto y col. (2002).

Los resultados obtenidos por las pruebas globales de la hemostasia nos permiten vislumbrar que posiblemente los péptidos provenientes del amaranto, liberados durante la digestión de las proteínas, actúen sobre la vía común de la coagulación (etapa de fibrinoformación), y en menor medida podrían actuar sobre la vía intrínseca. Apoyándonos en los resultados obtenidos empleando el hemostatómetro, podemos proponer posibles efectos inhibidores en la etapa de la coagulación dado que se observaron aumentos del tiempo de coagulación en la sangre de los animales pertenecientes al grupo amaranto respecto al grupo control. Sin embargo, no podemos dejar de considerar que las proteínas de amaranto ejerzan efectos en la agregación plaquetaria, que no pueden observarse durante la realización de las pruebas globales de la hemostasia, pero sí son estudiados en el hemostatómetro y en el tiempo de sangría, previamente analizados.

Se puede concluir, apoyándonos en los estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*, que los péptidos que se encuentran encriptados en las proteínas de amaranto, una vez liberados durante la digestión gastrointestinal son capaces de ejercer un efecto antiplaquetario y/o anticoagulante, lo cual convierte a la muestra en un potencial antitrombótico. Es importante tener presente que, ya que la administración del aislado proteico se realizó incorporándolo en la dieta diaria de los animales, los péptidos activos generados durante la digestión deben haberse absorbido en el intestino de las ratas y pasado al sistema circulatorio donde ejercen su efecto antitrombótico.

Otros autores, integrantes de nuestro grupo de investigación han informado sobre la actividad vasodilatadora de hidrolizados de amaranto sobre músculo liso, particularmente sobre anillos de aorta (Fritz y col., 2011). La vasodilatación es un fenómeno que colateralmente incide sobre los eventos circulatorios obstructivos. Al disminuir la vasoconstricción, efecto comprobado por Fritz y col. (2011) la sangre fluirá y tanto las plaquetas como los factores séricos se moverán más fácilmente que en caso de reducirse la luz de los vasos. El potencial efecto vasodilatador de las proteínas de amaranto podría tener incidencia en este trabajo de Tesis, únicamente en el ensayo del tiempo de sangría, ya que la transección de la cola de la rata implica el corte de la arteriola que la irriga. En los otros ensayos, *ex vivo* e *in vitro*, la actividad del músculo liso no se pone en juego. Aunque nuestros resultados indicaron que el tiempo de sangría de las ratas alimentadas con amaranto no resultó significativamente mayor al detectado para los animales del grupo control, se observa una tendencia que podría incluir también el efecto de la vasodilatación informada previamente por Fritz y col. (2011).

5.2.3 Fraccionamiento del aislado sometido a digestión gastrointestinal simulada

Los resultados descriptos previamente y que fueron obtenidos en los ensayos con animales, *in vivo* y *ex vivo*, sugieren que la ingesta de las proteínas del aislado de amaranto produce efectos antitrombóticos en las ratas. Por otro lado el aislado proteico de amaranto que fue sometido a digestión gastrointestinal simulada (Hdr_{DGS}) fue el hidrolizado que presentó la mayor inhibición de la coagulación en los estudios *in vitro* (Resultados I 4.3.2). La conjunción de los resultados logrados con estas dos estrategias de estudio nos llevó a intentar identificar a las sustancias responsables de la bioactividad.

Para eso utilizamos las muestras que se sometieron a la digestión gastrointestinal simulada. A fin de separar los componentes activos en el Hdr_{DGS} se decidió emplear la cromatografía como paso de purificación. En esta oportunidad utilizamos cromatografía de filtración en gel (FPLC), en columna Superdex 75 que separa especies proteicas de masa molecular entre 3 y 70 kDa. Las condiciones de corrida se describieron en Materiales y métodos (3.2.4.1), la muestra se solubilizó en buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl

0,12 mM, pH 7,2 y se eluyó con el mismo solvente. Se realizaron varias corridas sucesivas obteniéndose cromatogramas similares al que se muestra en la **Figura RII.10**. Las fracciones eluidas de la columna se colectaron en tubos, recogiendo 2 ml por tubo. A cada fracción colectada se le analizó la actividad antitrombótica utilizando el ensayo de las microplacas (Materiales y métodos 3.3.1.1). Se estudió la inhibición de la coagulación en todos los tubos colectados, y se encontró que la fracción correspondiente al volumen de elución entre 14 y 16 ml, (recuadro verde marcado en la **Figura RII.10**) fue la única que presentó inhibición de la formación del coágulo.

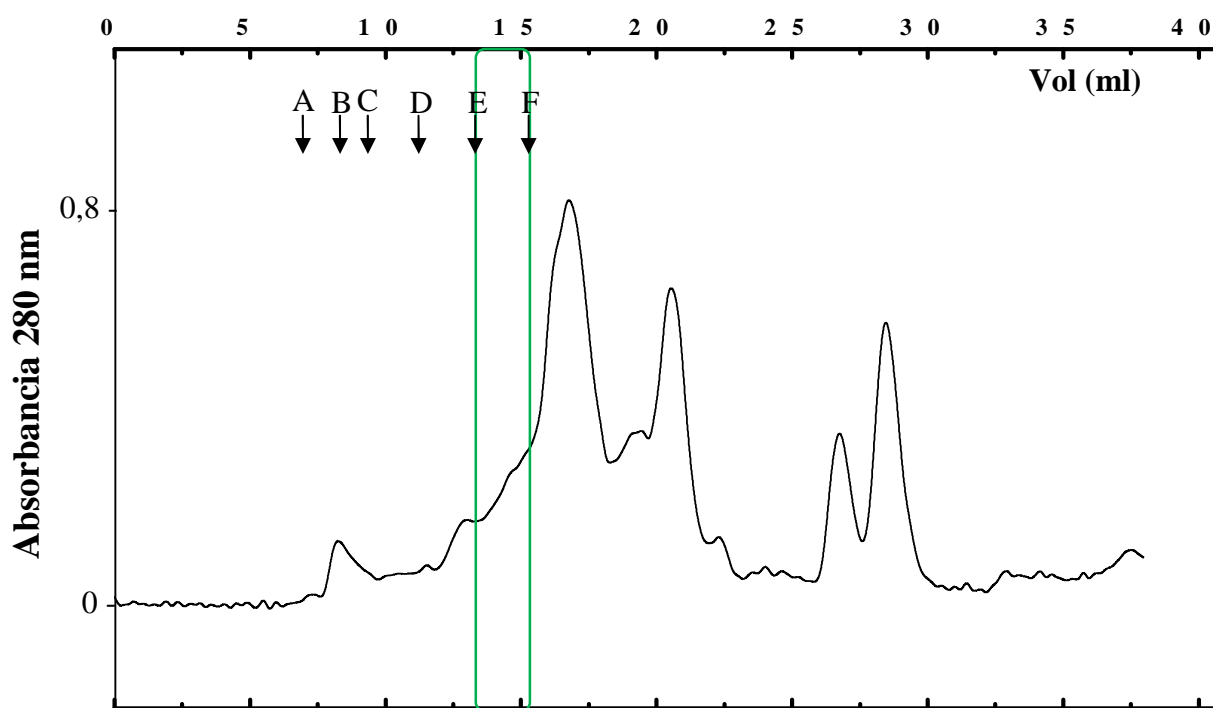


Figura RII.10 Cromatograma del Hdr_{DGS} eluido con buffer TRIS-HCl 0,05 M, NaCl 0,12 mM, pH 7,2. Con el recuadro verde se indica la fracción que presentó bioactividad. La columna se calibró con azul dextrano (A), albúmina (B), ovoalbúmina (C), quimotripsina (D), ribonucleasa (E), y aprotinina (F).

Una vez localizada la fracción activa en el cromatograma obtenido con el Hdr_{DGS}, se realizaron sucesivas cromatografías, más de diez, para colectar en todas ellas la fracción que presentó actividad. Finalmente, se estudió la actividad antitrombótica de la fracción activa encontrada en función de la concentración de proteínas. En la **Figura RII.11** se presenta la curva de inhibición de la coagulación a medida que aumenta la concentración de proteína, obtenida con la fracción en estudio. Esta curva, del tipo dosis-

respuesta, nos permitió obtener la concentración de proteínas que inhibe 50% de la formación del coágulo. Para obtener el parámetro IC_{50} , así como ya se describió en Resultados I, se utilizó el programa GraphPad Prism 5 con la aplicación para ajuste de curvas sigmoideas. La fracción activa presentó inhibición a partir de 0,03 mg/ml proteína, inhibiendo totalmente la formación del coágulo cuando la concentración de proteínas fue 0,17 mg/ml (100% de inhibición). El IC_{50} obtenido a partir de la curva fue $0,07 \pm 0,01$ mg/ml. Este resultado indica que la fracción separada por exclusión molecular es tres veces más potente que la muestra de la que proviene, es decir el Hdr_{DGS} sin fraccionar, cuyo IC_{50} fue $0,23 \pm 0,02$ mg/ml proteína (Resultados I, Tabla RI.8), indicando que el fraccionamiento fue adecuado y efectivo para la obtención de compuestos bioactivos.

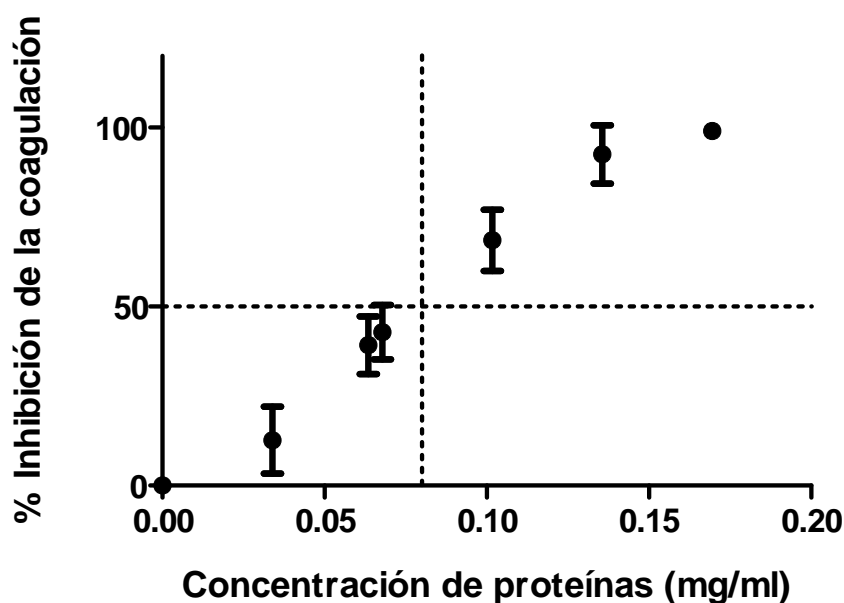


Figura RII.11 Curva de inhibición de la coagulación de la fracción activa obtenida a partir del Hdr_{DGS}. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En la **Figura RII.12** se presenta el gel electroforético Tricina-SDS-PAGE realizado con el objeto de caracterizar la fracción activa obtenida. Puede observarse que el perfil del aislado proteico de *Amaranthus hypochondriacus* preparado para estos ensayos es similar al previamente descrito en Resultados I. De igual manera, el hidrolizado por digestión gastrointestinal simulada también presenta un perfil similar al detallado en el capítulo anterior donde se destacan bandas entre 26 y 20 kDa y se aprecia también una

gran cantidad de bandas de pesos moleculares inferiores a los 14,4 kDa. El perfil exhibido por la fracción activa (FA) conserva la banda más nítida presentada por el Hdr_{DGS} de 22 ± 1 kDa junto con algunas de bajo peso molecular que presentan muy baja intensidad.

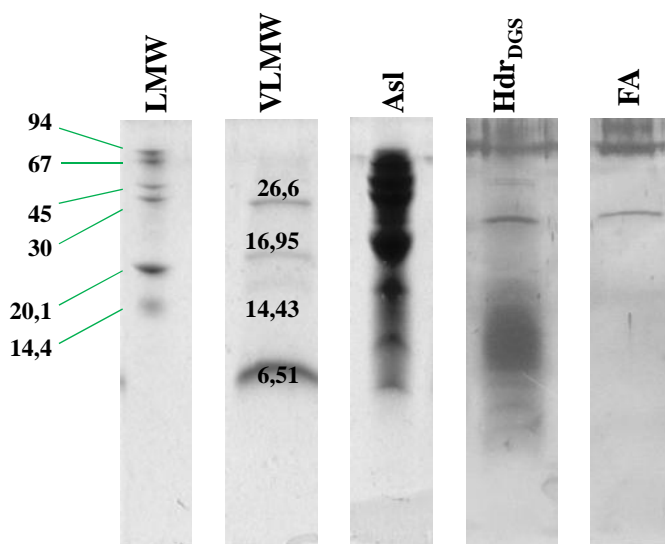


Figura RII.12 Gel electroforético Tricina-SDS-PAGE en presencia de 2-ME. Aislado de amaranto (**Asl**), hidrolizado obtenido por simulación de la digestión gastrointestinal (**Hdr_{DGS}**) y fracción activa separada de éste último (**FA**) por cromatografía de gel filtración. **LWM**: patrones de bajo peso molecular. **VLMW**: patrones de muy bajo peso molecular.

Con el objetivo de profundizar el estudio de la fracción activa, se decidió secuenciar los péptidos que la integran. Para eso, se liofilizó la muestra reuniendo previamente los volúmenes de los tubos correspondientes a la fracción activa obtenidos en las sucesivas cromatografías. Esta muestra fue analizada mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS (Materiales y métodos, 3.2.6), en el INRA, Unité BIA-Plateforme Biopolymères, Biologie Structurale, Nantes, Francia. Los resultados obtenidos, analizados utilizando el programa MASCOT 2.2 contra Uniprot restringida a taxonomía de *Amaranthus*, se discutirán más adelante en este capítulo.

5.2.3.1 Pruebas de absorción de la fracción activa a través del epitelio intestinal

Los resultados hallados en los ensayos con animales nos inducen a pensar que los péptidos activos que se liberaron durante la digestión fueron absorbidos a nivel

intestinal, atravesaron el enterocito sin sufrir modificaciones que anulen su actividad y pasaron al sistema circulatorio en el que ejercieron su acción.

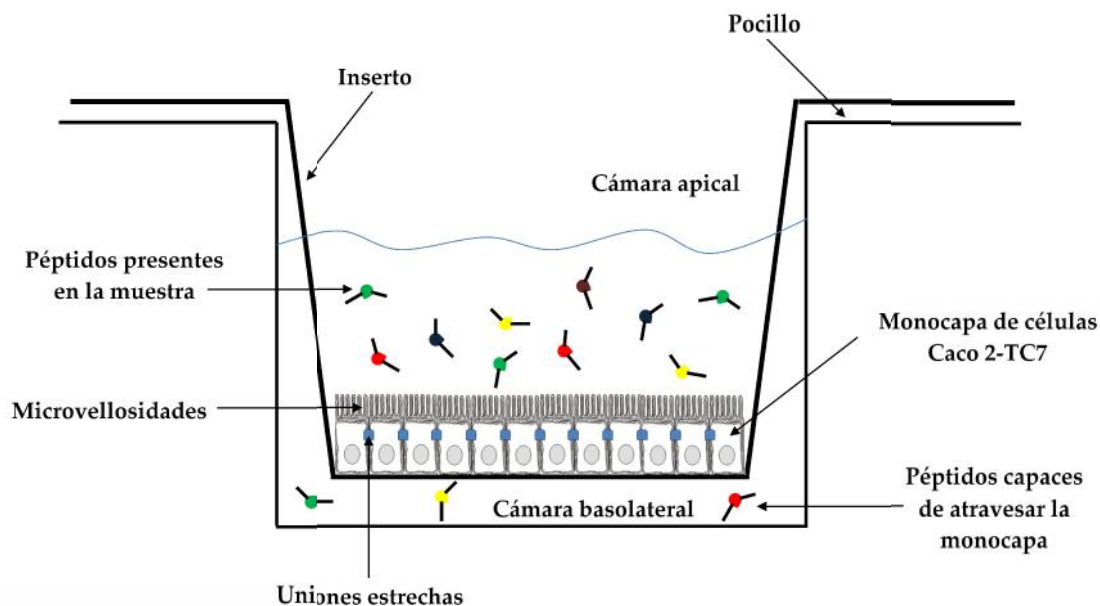


Figura RII.13 Esquema experimental utilizado para determinar absorción y transporte de los péptidos *in vitro*.

Con el fin de analizar si los péptidos que integran la fracción activa hallada por exclusión molecular del Hdr_{DGS} son capaces de sortear algunas de las barreras antes mencionadas, se planificó y ejecutó un ensayo *in vitro*. En el ensayo se enfrentaron los péptidos a un cultivo de células de epitelio intestinal, tal como se describió en Materiales y métodos (3.3.3). Para realizar los experimentos se utilizaron dispositivos denominados insertos, similares a filtros semipermeables sobre los cuáles se sembraron células de epitelio intestinal de modo que formen una monocapa (**Figura RII.13**). Se utilizaron células Caco 2-TC7, provenientes de una línea tumoral que luego de ser cultivadas mantienen muchas características del epitelio intestinal normal. La monocapa desarrollada en el inserto y la geometría del dispositivo, permiten establecer una disposición similar a la que existe *in vivo* en la mucosa intestinal, obteniéndose dos compartimentos separados por la monocapa celular. Los compartimentos, llamados cámara apical y cámara basolateral, podrían asociarse a los espacios correspondientes a las instancias previa y posterior a la absorción a través del epitelio intestinal. Una vez formada la monocapa celular, se colocó la solución de los péptidos de la fracción activa (FA, 0,2 ml) en la cámara apical del inserto, mientras que en la cámara basolateral se

colocaron 0,65 ml de PBS, con el fin de estudiar la actividad transportadora de la monocapa celular en dirección apical-basolateral. Los insertos se incubaron durante 3 horas a 37°C en atmósfera conteniendo 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Una vez concluido el ensayo se tomó la totalidad de los volúmenes contenidos en las cámaras para analizarlos posteriormente mediante RP-HPLC (Materiales y métodos 3.2.4.2) y para determinar su actividad antitrombótica *in vitro* empleando el método de las microplacas.

5.2.3.1.1 Ensayo de citotoxicidad

Para interpretar los resultados obtenidos cuando las células se enfrentan a los péptidos de amaranto debemos estudiar el efecto que esas muestras ejercen sobre la viabilidad celular. Para descartar posibles efectos citotóxicos de la fracción activa obtenida a partir del aislado proteico de amaranto se realizó el ensayo del MTT (Materiales y métodos 3.3.3.6). Se utilizaron las mismas células Caco 2-TC7, se incubaron durante 24 horas a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y 90% humedad relativa. Una vez adheridas a la superficie se adicionó la muestra en estudio a distintas concentraciones y se incubaron en las mismas condiciones durante 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación con las muestras, se reemplazó el volumen por medio de cultivo conteniendo una sal de tetrazolio, MTT (metil tetrazolium), en concentración 0,5 mg/ml, y se incubaron nuevamente durante 3 horas. Si las células conservan actividad metabólica, es decir, conservan viabilidad, las deshidrogenasas mitocondriales convertirán la sal de tetrazolio en un compuesto coloreado que se libera de las células por lisis celular una vez finalizado el tiempo de incubación. El producto coloreado liberado se cuantificó determinando la absorbancia a 570 nm. Los valores de absorbancia se corrigieron restándoles el valor de absorbancia del blanco preparado con células incubadas con las muestras a estudiar, pero a las que no se le había adicionado el MTT.

La viabilidad celular frente a las muestras proteicas se calculó tal como fue descripto en Materiales y métodos (3.3.3.6). La determinación indicó que las células presentaron 100% de viabilidad a todas las concentraciones estudiadas de la fracción

activa, manteniéndose además la monocapa celular completamente íntegra. La mayor concentración de fracción activa utilizada fue $0,81 \pm 0,03$ mg proteína /ml (Lowry, Materiales y métodos 3.3.1.3).

Estos resultados obtenidos indican claramente que la muestra en estudio no resultó tóxica para las células. Por lo tanto, realizamos el ensayo en los insertos que simula la absorción y transporte de los péptidos de la fracción activa a través de la monocapa de células de epitelio intestinal.

5.2.3.1.2 Actividad antitrombótica

Una vez realizado el ensayo de absorción y transporte de péptidos de la fracción activa se colectaron los volúmenes de las cámaras apical y basolateral de los insertos. En ellos se determinó la actividad antitrombótica empleando el método de las microplacas (Materiales y métodos 3.3.1.1). La fracción activa, que fue la muestra colocada en la cámara apical, inhibió totalmente la formación del coágulo (100% inhibición, $0,81 \pm 0,03$ mg/ml proteína). Los resultados obtenidos al determinar la actividad antitrombótica después de la incubación se muestran en la **Tabla RII.2**. Puede observarse que el volumen recogido de la cámara apical presentó $91,6 \pm 2,0\%$ de inhibición de la formación del coágulo. La disminución de la actividad de la muestra colocada en la cámara apical una vez concluido el tiempo de incubación en los insertos podría estar relacionada con el pasaje de péptidos bioactivos a través de la monocapa celular, hacia la cámara basolateral.

Tabla RII.2 Determinación de la inhibición de la coagulación de los péptidos recogidos de las cámaras apical y basolateral de los insertos.

	% Inhibición de la coagulación Método de las microplacas
<i>Fracción activa (FA)</i>	$100,1 \pm 0,6$
<i>Contenido de la cámara apical de los insertos</i>	$91,6 \pm 2,0$
<i>Contenido de la cámara basolateral de los insertos</i>	$5,2 \pm 0,5$

En la **Tabla RII.2** se puede apreciar que la actividad antitrombótica determinada para el volumen recogido en la cámara basolateral fue muy inferior a la que se observó en la cámara apical, obteniéndose inhibición de la coagulación en $5,2 \pm 0,5\%$. Este

resultado en principio indicaría que alguna especie proveniente de la muestra que logró atravesar la monocapa celular inhibe la coagulación, o bien que las células liberaron alguna sustancia hacia el espacio basolateral capaz de inhibirla. Para discernir entre estas posibilidades se realizó el ensayo de los insertos con las células sin adicionarle ninguna muestra y se determinó la potencial inhibición de la coagulación de los fluidos contenidos en las cámaras apical y basolateral. Ambas determinaciones resultaron negativas, indicando la ausencia de sustancias con actividad antitrombótica.

Por lo tanto, se fortalece la hipótesis de que las sustancias con capacidad inhibitoria de la coagulación provengan de la fracción activa colocada en la cámara apical. Cabe mencionar que la concentración de proteínas en la cámara apical fue $0,75 \pm 0,08$ mg/ml mientras que la de la cámara basolateral no pudo ser detectada empleando el método de Lowry, ya que resultó extremadamente baja (Materiales y métodos 3.3.1.3).

No debe descartarse que el pasaje de tan baja cantidad de péptidos potencialmente activos pueda deberse a las condiciones del ensayo realizado, que respetaron las especificaciones descritas por Yamashita y col. (2000 y 2002). Es posible que aumentando el tiempo de incubación, por ejemplo, la cantidad de sustancias que logren atravesar la monocapa celular aumente.

5.2.3.1.3 *Análisis mediante RP-HPLC*

Para analizar las especies presentes en las cámaras apical y basolateral después de la incubación de la fracción activa con la monocapa celular en los insertos, se utilizó la cromatografía HPLC de fase reversa. Para eso se acopló una columna analítica Sephasil Peptide C8 (Materiales y métodos 3.2.4.2) que separa por polaridad, aunque también presenta cierto efecto de tamiz molecular.

Las muestras a analizar, volúmenes provenientes de las dos cámaras, se filtraron (Materiales y métodos, 3.2.4.2) y se inyectaron en el equipo de HPLC (100 μ l). Se recogió el volumen que eluyó de la columna durante los primeros 60 minutos, colocando 1,1 ml en cada tubo. Para poder interpretar los resultados se realizaron complementariamente cromatografías del buffer PBS y de la fracción activa estudiada.

Los cromatogramas obtenidos se analizaron comparativamente. A los picos de los cromatogramas de las muestras provenientes de las cámaras basolaterales se les restaron los picos provenientes de los cromatogramas obtenidos al inyectar PBS en la columna. Una vez eliminados todos los picos provenientes del PBS, logramos identificar 3 picos coincidentes con los presentes en los perfiles cromatográficos de las muestras procedentes de la cámara apical y de la fracción activa. Finalmente, entre todos los tubos colectados, se seleccionaron aquellos que correspondieran a dichos picos, se los liofilizó y se secuenciaron mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS en el INRA, Unité BIA-Plateforme Biopolymères, Biologie Structurale, Nantes, Francia (Materiales y métodos, 3.2.6). Los resultados obtenidos, los que se analizaron utilizando el programa MASCOT 2.2 contra Uniprot restringida a taxonomía de *Amaranthus*, se discutirán a continuación.

Cabe mencionar que, en situaciones normales, el epitelio intestinal tiene alta actividad proteolítica. Existen proteasas en los enterocitos que completan el trabajo proteolítico que se inicia en la luz del tracto gastrointestinal (Langguth y col., 1997; Vorotyntseva y col., 1984), por lo cual es posible que las especies colocadas en la cámara apical se modifiquen dentro de las células y que por acción de esas enzimas haya cambios en la actividad antitrombótica inicial. Si bien la estrategia experimental fue buscar las mismas especies en la fracción activa, en la cámara apical y en la basolateral, podrían ser otras especies las que también sean activas.

5.2.4 Determinación de las secuencias aminoacídicas de péptidos potencialmente antitrombóticos

Los análisis presentados en esta sección se realizaron en conjunto con la Lic. Agustina Estefanía Nardo (UNLP-CIDCA)

La fracción activa hallada mediante el fraccionamiento FPLC, exclusión molecular y que presenta alta bioactividad fue enviada a analizar al INRA (Unité BIA-Plateforme Biopolymères, Biologie Structurale, Nantes, Francia) como ya ha sido mencionado en este capítulo y en Materiales y métodos 3.2.6.

Brevemente, se realizó un análisis MALDI-TOF de la fracción activa y posteriormente se llevó a cabo un estudio de los péptidos contenidos en la misma por nanocromatografía líquida con espectrometría de masas asociada (LC-MS/MS) para obtener las secuencias. La información obtenida se analizó utilizando el programa MASCOT 2.2 contra Uniprot restringida a taxonomía de *Amaranthus*.

En la **Figura RII.14** se presenta el espectro de masa MALDI obtenido luego del análisis por MALDI-TOF que fue realizado con el objeto de estudiar la complejidad de la muestra y estimar las masas moleculares de los péptidos presentes. Se pudo observar que una gran cantidad de masas presentaron pesos moleculares inferiores a los 4000 Da, razón por la cual se procedió a analizar los péptidos por nanocromatografía líquida acoplada a detectores de masa en tandem (MS/MS) para obtener datos de las secuencias.

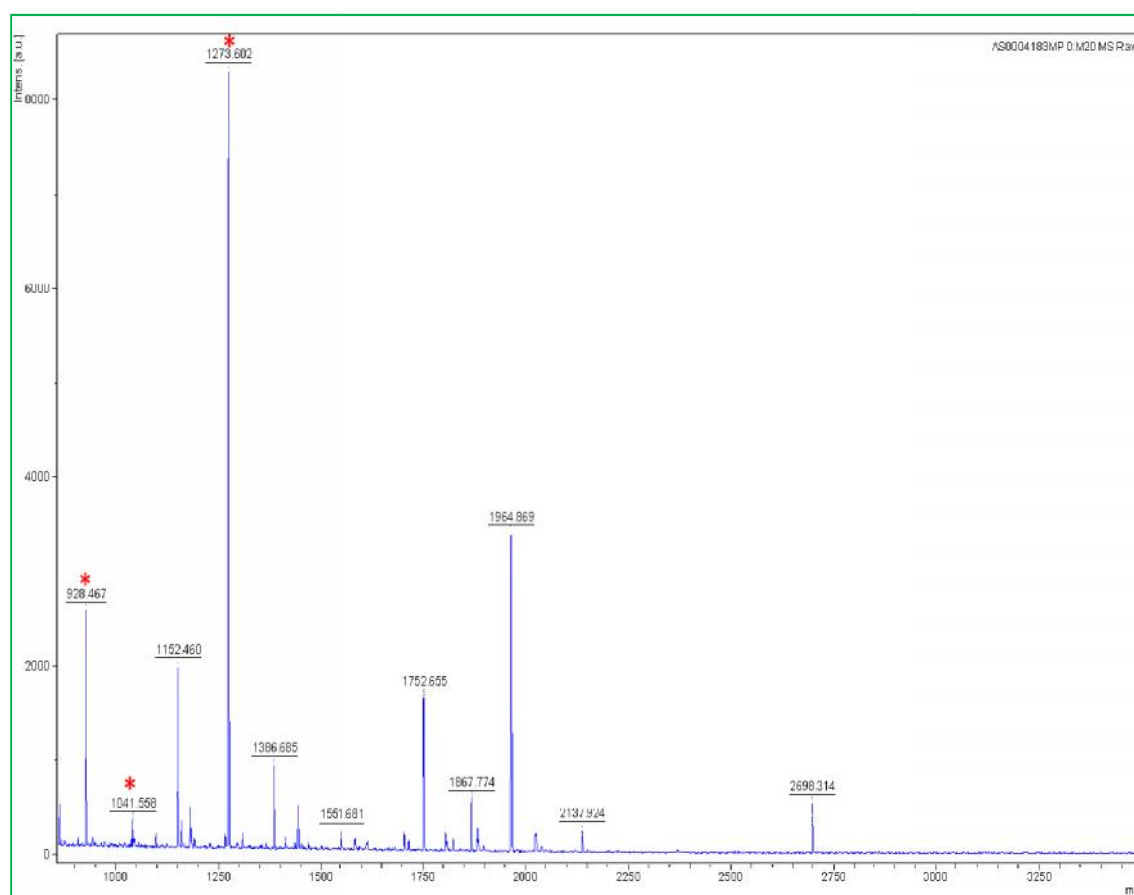


Figura RII.14 Espectro de masas MALDI de la fracción activa.

Al comparar los resultados del MALDI con los del LC-MS/MS se encontró que un gran número de picos no lograron ser identificados. De hecho, de todas las especies halladas, solamente tres, correspondientes a los picos marcados con el asterisco rojo en la

Figura RII.14, pudieron identificarse. Otras masas significativas (ejemplo, 1964,86 o 1752,65) fueron detectadas por LC-MS/MS pero no pudieron identificarse en la base de datos. La imposibilidad para identificar estos picos se debe a que pocas proteínas de amaranto se encuentran secuenciadas. Por esta razón la base de datos Uniprot no contiene secuencias de algunas proteínas de importancia dentro de la taxonomía *Amaranthus*, como por ejemplo la globulina 7S, una de las proteínas de reserva mayoritarias en las semillas de amaranto.

Con el objetivo de lograr información de los picos correspondientes a los de las masas moleculares que no se identificaron, se realizó una secuenciación *de novo*. Utilizando algoritmos que permitieran establecer la posible secuencia, los péptidos completos fueron evaluados mediante dos medidas: la confianza total, calculada como la sumatoria de la confianza para la posición de cada aminoácido en la secuencia y la confianza local promedio, que resulta del cociente de la confianza total y la longitud del péptido. Este análisis lamentablemente no permitió alcanzar resultados confiables.

Los tres picos identificados en el MALDI (asteriscos rojos en la **Figura RII.14**) contenían varios péptidos cuyas secuencias pertenecen a las proteínas que se indican en la **Tabla RII.3**. Como puede observarse, en algunos casos se hallaron varias secuencias pertenecientes a la misma proteína, las que pudieron agruparse en familias o grupo de secuencias pertenecientes a una misma región (**Tabla RII.3**).

Tabla RII.3 Resultados obtenidos por MALDI-TOF y LC-MS/MS, y MASCOT 2.2-Uniprot. Proteínas donde se encuentran las secuencias identificadas de la fracción activa.

<i>Proteína a la que pertenece</i>	<i>Nro de secuencias encontradas</i>	<i>Nro de familias</i>
<i>Globulina 11S (Amaranthus hypochondriacus)</i>	32	9
<i>Aglutinina (Amaranthus caudatus)</i>	11	6
<i>Alérgeno del polen (Amaranthus retroflexus)</i>	8	5
<i>Cistaína (Amaranthus hypochondriacus)</i>	2	2
<i>NAD málico dependiente (Amaranthus hypochondriacus)</i>	2	2
<i>Betaína aldehído deshidrogenasa (Amaranthus hypochondriacus)</i>	1	1
<i>NADH deshidrogenasa (Amaranthus blitoides)</i>	1	1

La fracción activa en estudio proviene del aislado proteico de amaranto. Siendo que el aislado proteico se compone principalmente de las proteínas de reserva, se decidió analizar las secuencias encontradas dentro de las mismas (globulina 11S y aglutinina). La

mayor cantidad de péptidos detectados hallados en la fracción activa pertenecen a la globulina 11S, secuenciada por Molina y col. (2008), y a la aglutinina, también denominada lectina, secuenciada por Rinderle y col. (1989). Los péptidos identificados provenientes de estas proteínas se agruparon en familias de acuerdo a las regiones de la secuencia a la cual pertenecen (**Tabla RII.3**). En las **Figura RII.15** y **RII.16** se muestran las secuencias de las proteínas globulina 11S y aglutinina, respectivamente; se presentan, resaltadas en fucsia, las familias de péptidos identificados en la fracción activa que resultaron coincidentes con partes de las proteínas mencionadas.



Figura RII.15 Secuencia de la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus* (tr|A2I9A6|A2I9A6_AMAHP). En rosa se encuentran marcadas y numeradas las familias de péptidos identificadas en la fracción activa, y en negro el sitio de corte que da origen a los polipéptidos ácido y básico. Cobertura de la secuencia: 24%.

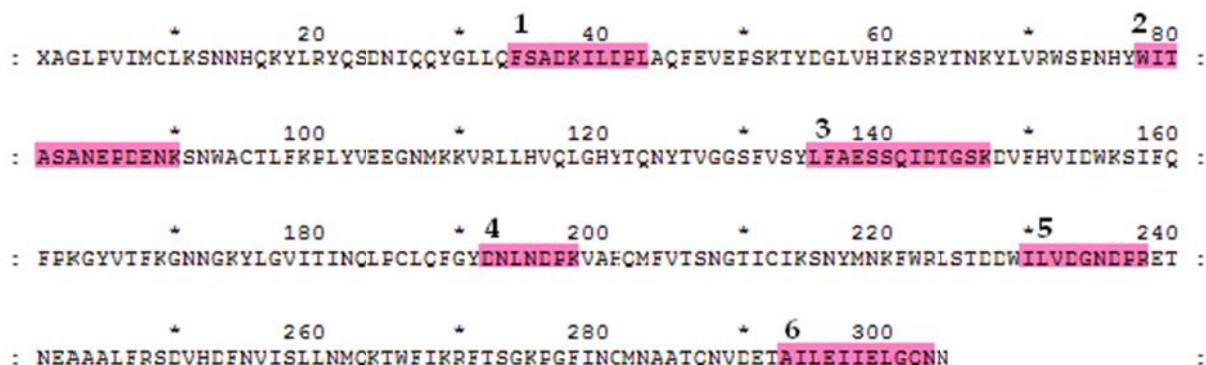


Figura RII.16 Secuencia de la aglutinina de *Amaranthus caudatus* (tr|Q71QF2|Q71QF2_AMACA). En rosa se encuentran marcadas y numeradas las familias de péptidos identificadas en la fracción activa. Cobertura de la secuencia: 21%.

Se identificaron 9 familias de péptidos provenientes de la globulina 11S y 6 familias de péptidos de la lectina de amaranto (**Tabla RII.3**). Las secuencias identificadas corresponden al 24% de la secuencia de la 11S y al 21% de la secuencia de la aglutinina.

Los picos de los cromatogramas HPLC seleccionados provenientes de la cámara basolateral de los insertos una vez incubada la fracción activa con las células del epitelio intestinal (sección 5.2.3.1.3) también fueron analizados a fin de conocer las secuencias de los péptidos que atravesaron la monocapa celular. La **Tabla RII.4** muestra las proteínas a las que pertenecen las secuencias identificadas, la cantidad de secuencias encontradas en cada una de ellas y la cantidad de familias que conforman éstas secuencias.

Tabla RII.4 Resultados obtenidos por MALDI-TOF y LC-MS/MS y MASCOT 2.2-Uniprot. Proteínas donde se encuentran las secuencias identificadas dentro del contenido de la cámara basolateral.

<i>Proteína a la que pertenece</i>	<i>Nro de secuencias encontradas</i>	<i>Nro de familias</i>
<i>Globulina 11S (Amaranthus hypochondriacus)</i>	2	2
<i>Aglutinina (Amaranthus caudatus)</i>	2	2
<i>ATP sintetasa</i>	2	2
<i>Enzima mállica</i>	1	1
<i>Inhibidor de tripsina</i>	1	1
<i>Almidón sintasa</i>	1	1

Las fracciones colectadas en el HPLC, al igual que la fracción activa, provienen del aislado proteico de amaranto. Ya que se compone principalmente de las proteínas de reserva nos enfocamos en las secuencias pertenecientes a globulina 11S y aglutinina (**Tabla RII.5**).

Tabla RII.5 Secuencias de las fracciones colectadas provenientes de la cámara basolateral pertenecientes a proteínas de reserva. En rojo se resaltan aquellas secuencias coincidentes con secuencias identificadas en la fracción activa.

<i>Proteína</i>	<i>Secuencias encontradas</i>	
<i>Globulina 11S</i>	<i>RTIEP</i>	<i>DVYTPE</i>
<i>Aglutinina</i>	<i>VEEGNM</i>	<i>AESSQIDTGSK</i>

Teniendo en cuenta las secuencias aminoacídicas de las familias identificadas y localizadas en la globulina 11S y en la aglutinina, se trabajó en la identificación de las secuencias candidatas a ser las responsables de la bioactividad. Con el objeto de definir cuáles secuencias se sintetizarán para realizar posteriores estudios, se analizó la composición aminoacídica de las mismas comparándolas con péptidos antitrombóticos

identificados y disponibles en bases de datos, y con las secuencias de los sustratos fisiológicos de la enzima trombina.

Selección de secuencias potencialmente inhibidoras de trombina

Las secuencias identificadas fueron comparadas con secuencias de péptidos con actividad antitrombótica derivados de proteínas alimentarias tomando como referencia la base de datos BIOPEP (Minkiewicz y col., 2010), en la que, en mayo de 2014, se encontraron 56 péptidos antitrombóticos. Ninguno de ellos presentó coincidencias con las secuencias encontradas en la fracción activa. Por esta razón se decidió emplear otros criterios que nos permitieran seleccionar aquellas secuencias que se sintetizarán para realizar posteriores estudios.

Los criterios utilizados para la selección de péptidos se relacionaron con el establecimiento de interacciones entre los péptidos y la enzima trombina (Introducción 1.2.2.2). Como hemos mencionado en repetidas oportunidades, la trombina es una serinproteasa que participa en el final de la cascada de la coagulación, conocida también como vía común. Esta enzima interacciona preferentemente con sustratos que posean aminoácidos cargados positivamente en una posición definida, denominada P1 (**Figura RII.17**) cuando se utiliza la nomenclatura de Schechter y Berger (1967). Estos autores nombran de modo definido a los aminoácidos que se ubican en la zona de escisión del enlace peptídico, es decir en el sitio de corte de las proteasas (Huntington, 2005). La nomenclatura se muestra en la **Figura RII.17**.

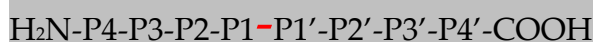


Figura RII.17 Nomenclatura de Schechter y Berger.
En rojo se muestra el enlace escindido por la enzima.
Tomada de Huntington (2005).

La interacción que establece la trombina con sus sustratos naturales ha sido estudiada; se conoce que presenta preferencias por aquellas secuencias que contengan arginina en la posición P1, prolina en P2 y un residuo hidrofóbico, el cual suele ser

aromático, en P4 (Bajusz y col., 1990; Huntington, 2005; Hirsh y col., 2005; Mehta y col., 2013). La regulación de la actividad de la trombina se realiza a través de un mecanismo complejo en el cual participan, además del sitio activo propiamente dicho, dos exositos llamados I y II (**Figura RII.18**). Mientras el sitio activo tiene preferencia por aminoácidos cargados positivamente, ambos exositos tienen preferencia por sustratos cargados negativamente. El exosito I exhibe además afinidad por sustratos hidrofóbicos (Huntington, 2005).

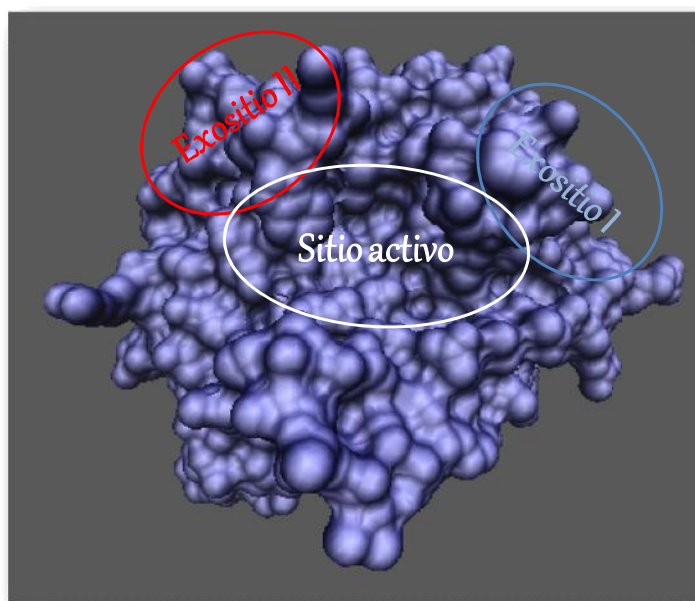


Figura RII.18 Enzima trombina en su orientación estándar. Se muestran el sitio activo y los exositos I y II.

Para poder seleccionar algunos péptidos entre todos los encontrados en la fracción activa se establecieron criterios que nos permitieran tener en consideración la afinidad y el mecanismo de reconocimiento entre los péptidos y la trombina. Los criterios utilizados se basaron en el trabajo de Huntington (2005) y para definirlos se establecieron algunos parámetros que involucran las características y cantidades relativas de los distintos tipos de aminoácidos: la *fracción neta de carga negativa* y la *fracción neta hidrofóbica*. La primera se calculó sustrayendo los residuos básicos de los ácidos y dividiendo por el número total de residuos y la segunda se calculó haciendo la relación entre los residuos hidrofóbicos y el número total de residuos. Una vez establecidas estas consignas se definieron los criterios que se indican a continuación:

Probable interacción del péptido con el sitio activo de la trombina: para este sitio se determinó la cantidad de aminoácidos cargados positivamente y la distribución de los mismos en las secuencias encontradas.

Probable interacción de los péptidos con el exosito I: cuando la fracción neta de carga negativa se divide por la fracción neta de carga hidrofóbica y el valor resulta < 2 existe una alta probabilidad de interacción de la secuencia con el exosito I. Los contactos hidrofóbicos proveen la mayor parte de las energías de enlace para las interacciones del péptido con el exosito I, mientras que las interacciones electrostáticas estarían principalmente involucradas en orientar las superficies hidrofóbicas complementarias (Karshikov y col., 1992; Myles y col., 2001).

Probable interacción de los péptidos con el exosito II: cuando la fracción neta de carga negativa se divide por la fracción neta de carga hidrofóbica y el valor resulta > 2 , existe una alta probabilidad de interacción de la secuencia en cuestión con el exosito II. Las interacciones electrostáticas son las que predominan cuando los péptidos establecen interacciones con este exosito.

Basándonos en los criterios de selección anteriormente mencionados y aplicándolos a las secuencias de las familias de péptidos halladas, se seleccionaron las secuencias que se presentan en la **Tabla RII.6**. A esta lista de péptidos candidatos a ser sintetizados se sumaron los hallados en la cámara basolateral que fueron también encontrados en la fracción activa (**Tabla RII.5 y 6**), para sintetizarlas y realizar futuros estudios con los péptidos sintéticos. La Tabla muestra además de las secuencias mencionadas, la familia a la que pertenecen, el criterio por el cual han sido seleccionadas, indicando la probabilidad de interaccionar con el sitio activo, el exosito I o el II o su presencia en la cámara basolateral después de los ensayos de simulación de absorción y transporte en los insertos.

Tabla RII.6 Secuencias candidatas para sintetizar.**Globulina 11S**

<i>familia</i>	<i>secuencia</i>	<i>criterio</i>	<i>Nro aminoácidos</i>
2	IQAEAGLTEV	<i>exositio I</i>	10
2	TEVWDSNEQE	<i>exositio II</i>	10
4	IDTANHANQLD	<i>exositio I</i>	11
4	IDTANHANQLDK	<i>sitio activo</i>	12
5	LAGKPQQEHSGEHQ	<i>sitio activo</i>	15
7	DVYTPE	<i>inserto</i>	6
8	NDQGQSVFDEELS	<i>exositio II</i>	13
9	AFEDGFE	<i>exositio I</i>	7

Aglutinina

4	DNLNDPK	<i>sitio activo</i>	7
5	LVDGNDPR	<i>sitio activo</i>	8
3	AESSQIDTGSK	<i>inserto</i>	11

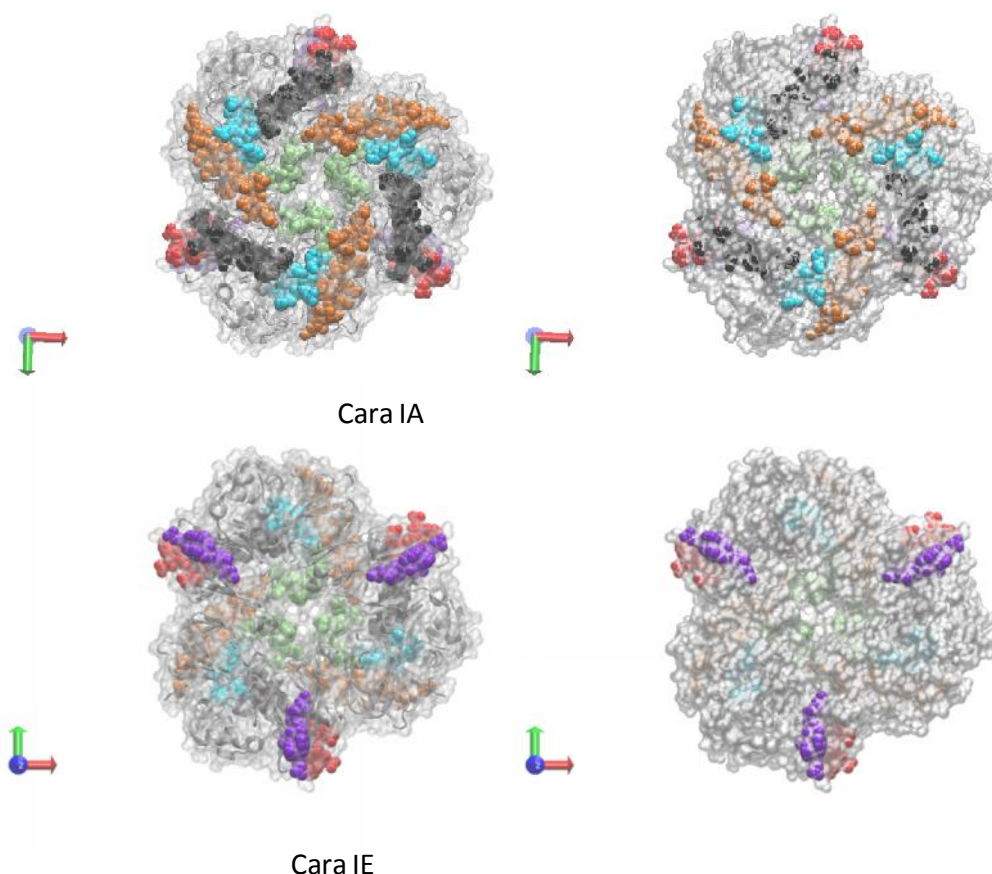


Figura RII.19 Ubicación de los péptidos seleccionados para su síntesis en la estructura del homotrímero de globulina 11S de *Amaranthus hypocondriacus* (PDB 3QAC). Los colores coinciden con aquellos que se utilizaron para presentar los péptidos en la **Tabla RII.6**. La Cara IE presenta un mayor número de residuos hidrofóbicos expuestos, y es la que participa en la interacción de dos trímeros para formar la estructura hexamérica de la globulina. La Cara IA se corresponde con la cara externa de la globulina 11S completa. Las estructuras ubicadas a la derecha presentan un mayor grado de opacidad.

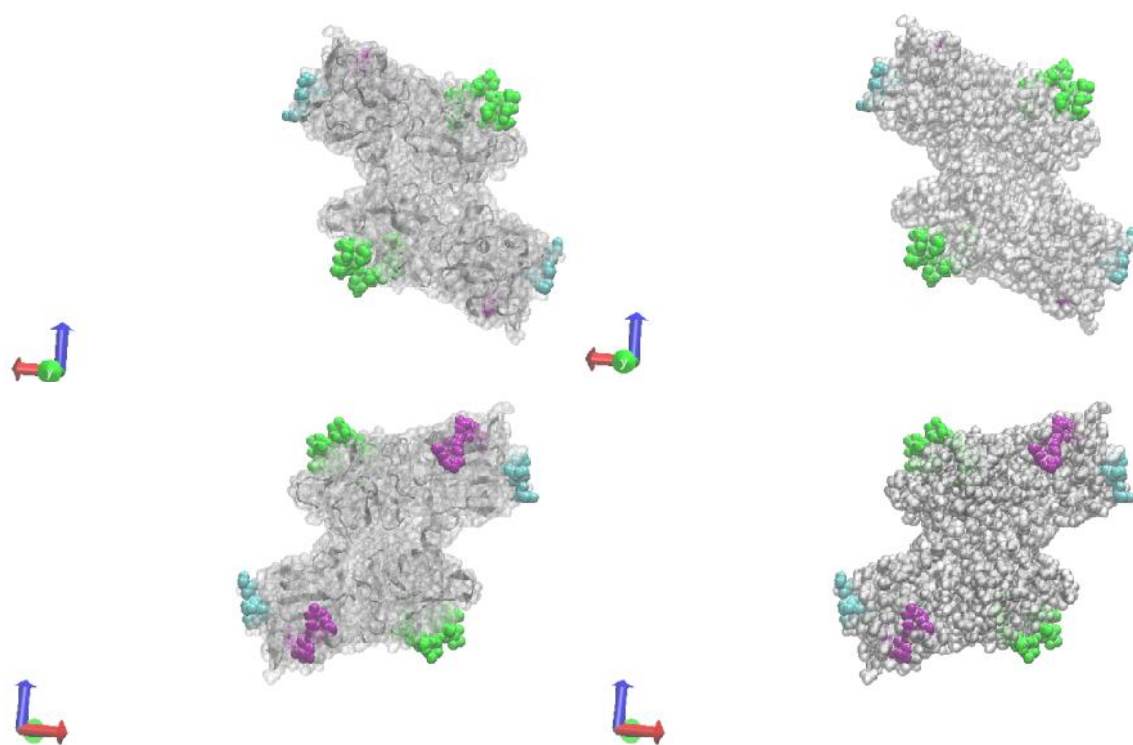


Figura RII.20 Ubicación de los péptidos seleccionados para su síntesis marcados en la estructura de la aglutinina de *Amaranthus caudatus* (PDB 1JLY), los colores coinciden con aquellos que se utilizaron para presentar los péptidos en la **Tabla RII.6**. Las estructuras ubicadas a la derecha presentan un mayor grado de opacidad.

En las **Figuras RII.19 y RII.20** se presentan las estructuras de la globulina 11S y de la aglutinina. Las imágenes de la izquierda y las de la derecha corresponden a la misma región de la molécula. Las que se muestran a la derecha presentan mayor grado de opacidad. Sobre las mismas se encuentran marcados los péptidos seleccionados para ser sintetizados (**Tabla RII.6**). Se puede apreciar en ambas que la mayoría de los péptidos se encuentran ubicados en la zona superficial de las proteínas, quedando más expuestos a posible ataques hidrolíticos. En este sentido cabe mencionar que el péptido **DVYTPE** hallado en la cámara basolateral de los insertos, se encuentra ubicado en la cara IE del homotrímero de la globulina 11S. En la molécula nativa hexamérica esta cara se encuentra unida por interacciones no covalentes a la del otro trímero. Por esta razón en el caso de que la molécula se encuentre nativa, con su estructura cuaternaria intacta, este péptido no quedaría expuesto al medio (Tandang-Silvas y col., 2012). Sin embargo la globulina 11S se separa en sus trímeros por efecto del pH, lo que asegura la accesibilidad de las proteasas a esa región de la molécula.

5.3 Conclusiones del capítulo

- ✓ En los ensayos *ex vivo* se observó que los parámetros asociados a la formación del tapón plaquetario (área y tiempo de recuperación) fueron significativamente diferentes para el grupo control y para el grupo que consumió amaranto, indicando un posible efecto del aislado proteico sobre esta etapa de la hemostasia. El parámetro asociado a la etapa de la coagulación (tiempo de coagulación) del grupo amaranto también presentó diferencias significativas con el obtenido para el grupo control, mostrando probables efectos inhibitorios por parte de las proteínas de amaranto sobre la cascada de la coagulación. Es importante destacar que estos últimos resultados coinciden con los obtenidos al estudiar la inhibición de la coagulación *in vitro* y al evaluar la actividad inhibitoria *ex vivo*, donde se encontraron aumentos significativos en los tiempos de formación del coágulo durante el estudio del tiempo de trombina determinado con plasma de los animales del grupo amaranto.
- ✓ Aunque los valores de tiempo de sangría no presentaron diferencias significativas entre el grupo amaranto y el grupo control, los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* sugieren que el aislado proteico de amaranto presenta acción antitrombótica. Esta tendencia debería confirmarse aumentando el número de animales utilizados en el ensayo y/o variando otras condiciones empleadas en el mismo.
- ✓ Se puede concluir, apoyándonos en estudios *in vitro* y *ex vivo*, que los péptidos que se encuentran encriptados en las proteínas de amaranto, una vez liberados durante la digestión gastrointestinal serían capaces de ejercer un efecto antiplaquetario y/o anticoagulante, lo cual convierte a la muestra en estudio en un potencial agente o compuesto antitrombótico.
- ✓ Se logró obtener una fracción con muy alta actividad antitrombótica *in vitro* mediante cromatografía de exclusión molecular por FPLC, cuya actividad resultó 3 veces mayor respecto al hidrolizado original.
- ✓ Las pruebas de absorción sobre la fracción activa encontrada junto con su secuenciación permitieron encontrar péptidos potencialmente bioactivos que logran

atravesar el epitelio intestinal representado por la monocapa celular desarrollada en el inserto.

A decorative graphic featuring three green circles of varying sizes. Each circle is surrounded by a light gray shadow. Two thin green lines intersect diagonally across the page, passing behind the circles.

RESULTADOS III

FRACCIONES PROTEICAS

6 RESULTADOS III

Fracciones Proteicas de Amaranto

Las fracciones proteicas de amaranto fueron preparadas y caracterizadas, tanto en aspectos estructurales como fisicoquímicos, y se realizaron sobre cada una de ellas estudios de la actividad antitrombótica *in vitro*, con el objeto de determinar si las especies bioactivas corresponden a alguna fracción proteica en particular. Los resultados obtenidos se presentan en este capítulo.

6.1. Caracterización de las fracciones proteicas

Las fracciones albúminas, globulinas, globulina P y glutelinas se obtuvieron a partir de semillas de *Amaranthus mantegazzianus* empleando el protocolo de extracción descrito en Materiales y métodos (3.1.4).

6.1.1 Rendimiento

Las fracciones proteicas se prepararon por extracción secuencial a partir de la harina desgrasada. La obtención de las fracciones en repetidas oportunidades permitió calcular el rendimiento de la extracción de cada una de ellas. Las albúminas y la globulinas P (GP) presentaron rendimientos más elevados que las fracciones globulinas y glutelinas (**Tabla RIII.1**). Los resultados obtenidos son comparables a los descritos por Martínez (1997), observándose un rendimiento levemente inferior de globulinas.

Tabla RIII.1 Rendimientos de obtención de las fracciones proteicas de amaranto

<i>Fracciones</i>	<i>Albúminas</i>	<i>Globulinas</i>	<i>GP</i>	<i>Glutelinas</i>
Rendimiento	$3,12 \pm 0,23$	$1,39 \pm 0,18$	$3,35 \pm 0,36$	$0,66 \pm 0,04$

g de fracción proteica/100 g harina desgrasada

6.1.2 Composición

A fin de caracterizar las fracciones en estudio, se determinó el contenido de proteínas de las mismas (**Tabla RIII.2**). Se puede observar que el contenido de proteínas de las fracciones albúminas (Alb), globulinas (Glb) y globulinas P (GP), fue similar al obtenido para los aislados proteicos descritos en Resultados I, mientras que el

contenido de proteínas de la fracción glutelinas (Glt), resultó significativamente menor. A fin de conocer la composición de esta fracción, la cual presenta una concentración porcentual proteica atípicamente baja, se determinó el contenido de cenizas y de hidratos de carbono. Los valores hallados, presentados en la **Tabla RIII.2**, nos permiten observar que las Glt presentan un elevado porcentaje de hidratos de carbono. Ello puede deberse a que durante los sucesivos pasos de obtención de las fracciones, el almidón, que se encuentra en la harina de amaranto en gránulos pequeños, podría solubilizarse parcialmente en las condiciones de pH alcalino utilizado para obtener la fracción glutelinas (Han y Lim, 2004), conduciendo a su co-extracción junto a las proteínas. Respecto al contenido de cenizas, se observa un importante aumento de las mismas comparado con aquel encontrado en los aislados. Esa significativa variación se debe al proceso de extracción utilizado, donde el solvente de extracción empleado (borato de sodio pH 10) aporta gran cantidad de iones al producto final obtenido, aumentando el contenido de cenizas.

Tabla RIII.2 Contenido de proteínas de las fracciones proteicas. Composición centesimal de la fracción glutelinas.

	<i>Albúminas</i>	<i>Globulinas</i>	<i>Globulina P</i>	<i>Glutelinas</i>
	<i>g cada 100 g de fracción proteica</i>			
<i>proteínas</i>	$73,2 \pm 2,4^b$	$72,6 \pm 1,3^b$	$79,1 \pm 1,8^c$	$32,1 \pm 1,8^a$
<i>cenizas</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	$17,9 \pm 0,8$
<i>carbohidratos</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	$43,3 \pm 0,1$

Diferentes letras de superíndice en la misma fila corresponden a diferentes valores ($\alpha = 0,05$, LSD).

6.1.3 Grado de hidrólisis

Las fracciones proteicas se sometieron al protocolo de hidrólisis utilizando dos enzimas, alcalasa y tripsina en forma sucesiva (Materiales y métodos 3.1.5.2), siguiendo el protocolo que se describió en Resultados I (4.2) para hidrolizar el aislado proteico de amaranto.

En la **Figura RIII.1** se presenta la evolución del grado de hidrólisis con el tiempo, obtenida para todas las fracciones proteicas. El GH% determinado sobre alícuotas

tomadas a distintos tiempos (2, 10 y 20 minutos de reacción con alcalasa y 2, 10 y 20 minutos una vez adicionada la tripsina, 22, 30 y 40 minutos de reacción global), aumenta en función del tiempo desde el inicio de la hidrólisis. El GH% presentó un brusco incremento al incorporar la tripsina en las fracciones Alb y GP aumentando luego más lentamente durante el transcurso de los últimos 20 minutos de reacción. Este comportamiento fue encontrado también en el aislado sometido a este mismo protocolo de hidrólisis (Resultados I 4.2.1.2) y podría deberse a que la acción de la alcalasa sobre las proteínas de amaranto podría dejar expuestos numerosos sitios de corte sobre los que actuaría la tripsina. Las cinéticas de proteólisis realizadas nos permitieron observar que el GH% aumenta significativamente con el tiempo de reacción en todas las muestras estudiadas ($\alpha = 0,05$, LSD), siendo ambas enzimas capaces de hidrolizar a las fracciones proteicas de amaranto de manera efectiva. El punto indicado con rombos en la Figura, corresponde a la respectiva muestra antes del agregado de la enzima alcalasa.

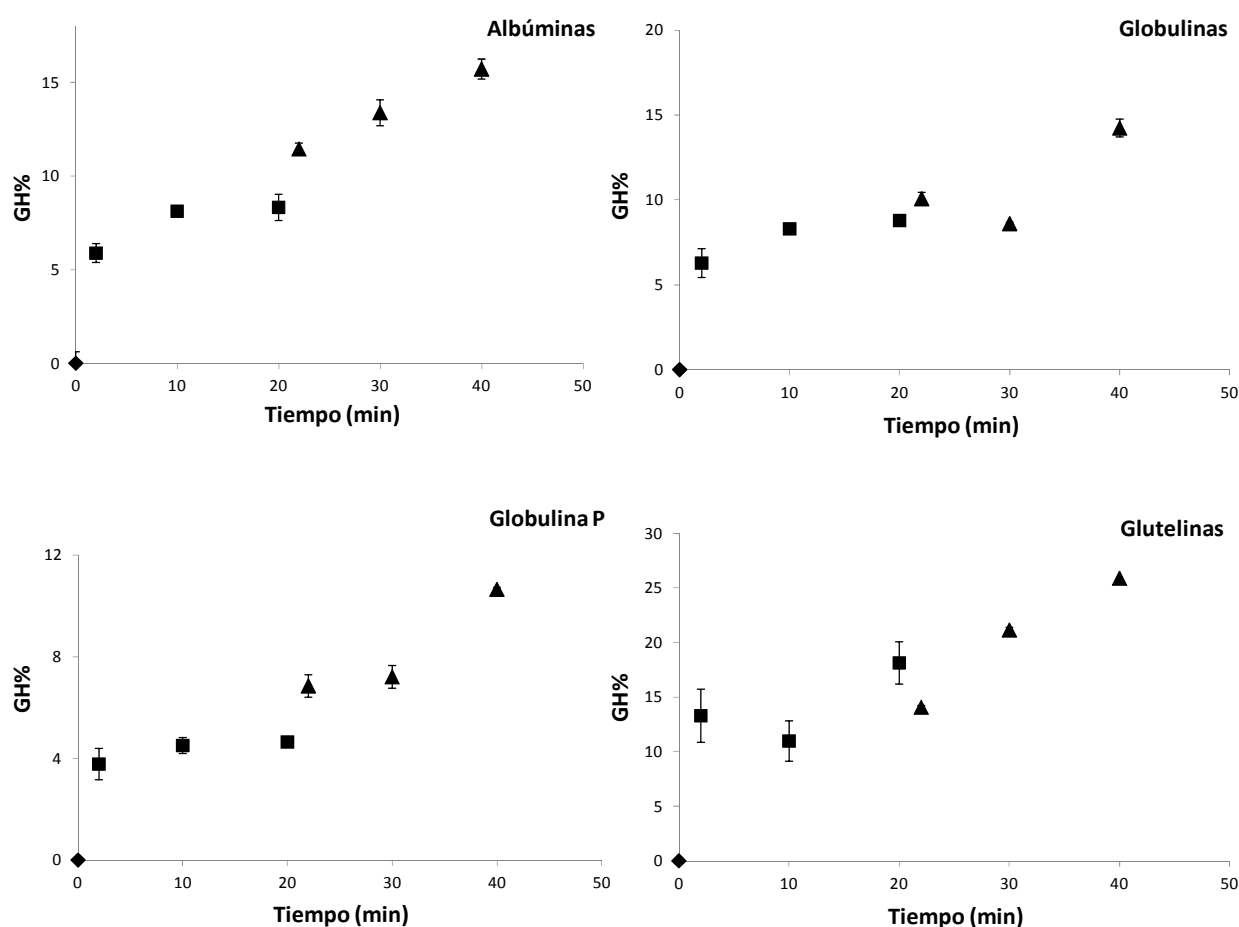


Figura RIII.1 Cinéticas de hidrólisis de las fracciones proteicas de amaranto. Control, fracción sin hidrolizar (rombos), alcalasa (cuadrados) y alcalasa+tripsina (triángulos). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Tal como se observa en la **Figura RIII.1**, el grado de hidrólisis alcanzado en las distintas fracciones proteicas es variable. En la **Tabla RIII.3** se presentan los valores de GH% alcanzados en los productos finales, es decir al término de los 40 minutos de reacción. Con la fracción glutelinas se obtuvo el mayor GH%, similar al alcanzado por el aislado proteico de amaranto cuando fue sometido al mismo protocolo de hidrólisis (Resultados I. 4.2.1.2). La fracción GP, resultó más resistente a la hidrólisis, mientras que Alb y Glb presentaron un grado de hidrólisis similar y menor al de la Glt. Es posible que el alto grado de polimerización que presenta la fracción GP (Castellani y col., 2000) sea la causa por la que las enzimas encuentren dificultades para acceder a los sitios específicos de corte.

Tabla RIII.3 GH% final de las fracciones proteicas de amaranto.

<i>Muestras</i>	<i>Albúminas</i>	<i>Globulinas</i>	<i>Globulina P</i>	<i>Glutelinas</i>
GH%	$15,7 \pm 0,5^b$	$14,2 \pm 0,5^b$	$10,6 \pm 0,1^a$	$25,9 \pm 0,1^c$

Diferente superíndice corresponde a diferentes valores ($\alpha = 0,05$, LSD).

6.1.4 Composición polipeptídica de las fracciones proteicas. Electroforesis

En la **Figura RIII.2** se muestran los perfiles electroforéticos de las fracciones proteicas y sus hidrolizados. Los perfiles de las fracciones presentan bandas características de sus polipéptidos constitutivos. Las globulinas y globulina P presentan agregados de alta masa molecular, unidades moleculares de 56 ± 1 y 52 ± 1 kDa, y polipéptidos de 36 ± 1 , 31 ± 2 kDa y 20 ± 2 y 22 ± 1 , correspondientes a las subunidades A y B respectivamente, que se encuentran unidos por puentes disulfuro en las globulinas 11S y P. Además se observan una banda de 67 ± 1 kDa y otras de baja masa molecular. Las albúminas presentan una gran cantidad de bandas que abarcan un amplio rango de masas moleculares, destacándose en dicha fracción la presencia de bandas de bajo peso molecular, las cuales se encuentran ausentes en los otros perfiles electroforéticos. En la fracción glutelinas se destacan bandas de pesos moleculares superiores a los 14,4 kDa, y entre ellas se destacan dos a 15 ± 1 y 20 ± 1 kDa. Los perfiles electroforéticos de las fracciones de amaranto exhibidos en la **Figura RIII.2** son coincidentes con aquellos

descriptos en trabajos previos (Martínez y Añón, 1996; Castellani y col., 2000; Abugoch, 2006; Quiroga y col., 2010).

Los perfiles electroforéticos de los hidrolizados proteicos muestran importantes modificaciones con respecto a sus fracciones nativas. Si bien la fracción Alb presenta péptidos de baja masa molecular (inferior a 14,4 kDa), las demás muestras sólo los contienen una vez que fueron sometidas a la hidrólisis. En los perfiles se observa la desaparición de bandas de alta masa molecular y aparición de péptidos cuya masa molecular es similar o inferior a 14,4 kDa. La fracción AlbH, albúminas hidrolizadas, contiene varios péptidos de pequeña masa molecular que no logran definirse como bandas en el perfil sino que aparecen como un continuo. Las fracciones globulina y globulina P hidrolizadas, GlbH y GPH respectivamente, muestran péptidos entre 20 y 26 kDa como los de mayor intensidad y un conjunto de péptidos más livianos. La fracción GltH, glutelinas hidrolizadas, presenta tres bandas de baja masa molecular de 6 ± 1 , 4 ± 1 y 2 ± 1 kDa bien definidas integrando el perfil.

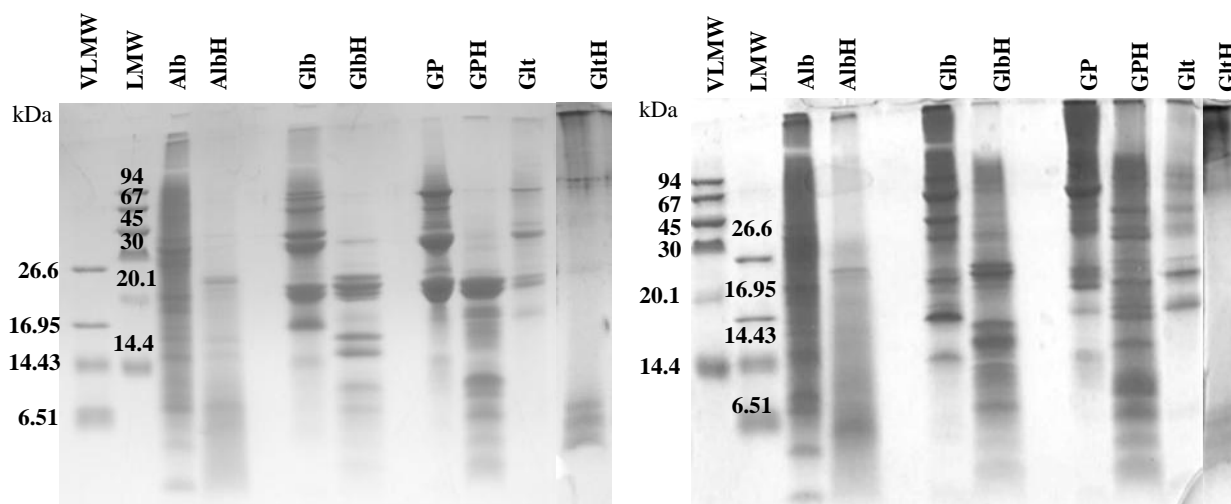


Figura RIII.2 Gel electroforético de Tricina-SDS-PAGE en presencia de 2-ME (izquierda) y sin 2-ME (derecha). Fracciones proteicas, albúminas (Alb), globulinas (Glb), globulina P (GP) y glutelinas (Glt) sin y con hidrólisis (Ej. Alb y AlbH). LWM: Patrones de bajo peso molecular. VLMW: Patrones de muy bajo peso molecular. La calle de Glt, a diferencia del resto, fue revelada con tinción de plata.

6.1.5 Análisis térmico (DSC)

Mediante la calorimetría diferencial de barrido (DSC) se obtuvieron los termogramas de las fracciones proteicas y sus respectivos hidrolizados. Las temperaturas

de desnaturalización (T_d) obtenidas en la máxima deflexión de los termogramas, y las entalpías de desnaturalización (ΔH) calculadas a partir del área de las endotermas registradas, se muestran en la **Tabla RIII.4**. Cuanto mayor sea la temperatura de pico, mayor será la estabilidad térmica de las proteínas. La entalpía del proceso, ΔH , representará al proceso en su conjunto, es decir será la suma algebraica de los calores o entalpías puestos en juego al romperse las interacciones preexistentes en las proteínas durante el calentamiento en el calorímetro, y por lo tanto, correlacionará con el grado de orden (tipo y número de uniones) que presenta la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína en cuestión (Koshiyama y col., 1981).

Tabla RIII.4 Parámetros térmicos de las fracciones proteicas de amaranto

<i>Muestras</i>	<i>Albúminas</i>	<i>Globulinas</i>	<i>Globulina P</i>	<i>Glutelinas</i>
<i>T_d (°C)</i>	<i>nd</i>	$72,4 \pm 0,2$ $97,5 \pm 0,1$	$103,9 \pm 0,5$	<i>nd</i>
<i>H (J/g)</i>	<i>nd</i>	$11,7 \pm 1,1$	$7,5 \pm 0,6$	<i>nd</i>

nd: no detectado

Tal como se puede apreciar en la **Tabla RIII.4** la fracción albúminas no presentó endotermas asociadas a su desnaturalización. Otros autores (Martínez y Añón, 1996) han informado transiciones térmicas para las albúminas de amaranto, las cuales presentaron bajas temperaturas y entalpías de desnaturalización (aproximadamente $T_d = 72^\circ\text{C}$ y $\Delta H = 2 \text{ J/g}$). Sin embargo, Tang y Wang (2010) han informado el mismo comportamiento hallado por nosotros para la fracción albúminas de trigo sarraceno. Estos autores propusieron que, considerando que los picos endotérmicos de proteínas en los termogramas del DSC están usualmente relacionados con la ruptura de puentes de hidrógeno, especialmente a aquellos que mantienen la integridad de la estructura terciaria de las proteínas más estructuradas como las globulinas, la ausencia de dichos picos en la fracción albúminas podría deberse o bien a que las interacciones puentes de hidrógeno que mantienen la conformación terciaria en estas proteínas son débiles, o bien los polipéptidos que conforman esta fracción no presentan una estructura que pueda perderse por calentamiento debido a la alta flexibilidad en la conformación terciaria. Si

bien estas especulaciones podrían explicar el comportamiento de esta preparación de albúminas, no puede descartarse que las ruptura endotérmicas (puentes de hidrógeno) y exotérmicas (interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, y menos probablemente formación de agregados por calentamiento) de las interacciones existentes en los polipéptidos y proteínas de esta fracción se compensen y den como resultado un calor neto de proceso igual a cero.

Las fracciones globulinas y globulina P presentaron valores de temperaturas y entalpía de desnaturalización (**Tabla RIII.4**) similares a las informadas por Martínez y Añón (1996), mientras que la fracción glutelinas, no presentó endotermas asociadas al proceso de calentamiento realizado en el DSC. Dado que se requieren condiciones de pH alcalino para la extracción de esta última fracción, es posible que durante la etapa de obtención las proteínas hayan perdido su estructura nativa, por lo cual no se observan endotermas.

Las fracciones proteicas que fueron sometidas a hidrólisis no presentaron ninguna endoterma al ser analizadas mediante calorimetría diferencial de barrido. Esto significa, que, al menos en las fracciones globulina y globulina P, en las que se detectaron endotermas antes de ser hidrolizadas, se produce la pérdida de la estructura que se apreciaba antes de la proteólisis (**Tabla RIII.4**).

6.1.6 Cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)

El efecto de la hidrólisis sobre las fracciones proteicas de amaranto puede observarse también en los perfiles de elución obtenidos utilizando columnas de gel filtración y un sistema FPLC. Las muestras Glb, GP y Glt con sus respectivos hidrolizados se separaron mediante la columna Superosa 6 (rango de exclusión 5 a 5000 kDa), mientras que para la fracción Alb y AlbH, se utilizó un relleno Superdex 75 (rango de exclusión 3 a 70 kDa). Los pesos moleculares de las especies eluidas fueron estimados mediante la ecuación de la recta obtenida con patrones de calibración para cada columna (Materiales y métodos 3.2.4.1).

El cromatograma de la fracción albúminas se presenta en la **Figura RIII.3**. A efectos de facilitar el análisis de los cromatogramas, éstos se dividieron en tres zonas:

verde, roja y azul. En la zona verde eluyen especies cuyas masas moleculares son superiores a 20 kDa, en la zona roja especies moleculares entre 20 y 1,5 kDa aproximadamente, y en la zona azul especies con masa molecular menor a 1,5 kDa.

En la figura se observa que las especies que conforman dicha fracción presentan masas moleculares inferiores a los 100 kDa, con una gran cantidad de picos por debajo de los 70 kDa. La **Tabla RIII.5** presenta las masas moleculares de los máximos de los picos de las especies separadas mediante la cromatografía realizada, los respectivos volúmenes de elución del máximo de absorbancia y las áreas porcentuales que corresponden a cada uno de ellos y a las diferentes zonas del cromatograma. Para identificarlos claramente, los picos se encuentran indicados con los mismos números en la Tabla y en la Figura en la que se observan los cromatogramas.

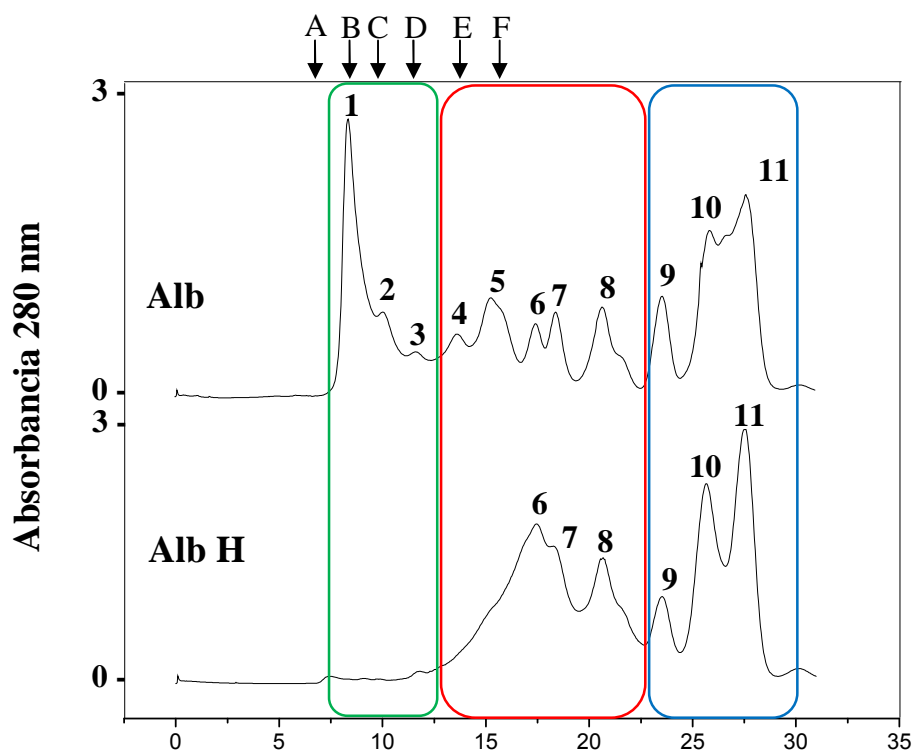


Figura RIII.3 Cromatogramas de la fracción albúmina (**Alb**) y su hidrolizado (**Alb H**) eluidos con buffer K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM y NaCl 0,4 M, pH 7,8. Columna Superdex 75. Los recuadros de color indican tres zonas de interés (volúmenes de elución entre 7,5-12,5 ml, **verde**; entre 12,5-22,5 ml, **rojo**; y entre 22,5-30,0 ml, **azul**). La columna se calibró con azul dextrano (**A**), albúmina (**B**), ovoalbúmina (**C**), quimotripsina (**D**), ribonucleasa (**E**), y aprotinina (**F**).

La fracción albúminas hidrolizada prácticamente no presenta picos en la zona de elución de altos pesos moleculares, observándose un corrimiento del perfil hacia la zona de pesos moleculares inferiores (**Tabla RIII.5**), generado por el proceso proteolítico al que fue expuesta.

Tabla RIII.5 Masa molecular (kDa) de las especies separadas en los cromatogramas de exclusión molecular de Alb y Alb H, sus respectivos volúmenes de elución, sus áreas porcentuales y las áreas de cada zona.

	ZONA	verde			roja					azul		
	Pico número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Vol elución (ml)	8,4	10,0	11,7	13,7	15,3	17,5	18,4	20,7	23,5	25,7	27,4
	Masa molecular máximo del pico (kDa)	60,1	39,5	25,7	15,4	10,3	5,9	4,7	2,6	1,3	0,7	0,5
Alb	% Área zona	28,9			31,1					40		
	% Área pico *	20,2	5,6	3,1	4,8	10,4	4,0	4,5	7,4	6,1	13,3	20,6
Alb H	% Área zona	0			55,1					44,9		
	% Área pico *	-	-	-	-	-	29,5	9,8	15,8	6,9	17,0	21,0

* área pico/área total x 100

El cromatograma de la fracción globulinas se presenta en la **Figura RIII.4**. Nuevamente, fue dividido en tres zonas: verde, roja y azul. En la zona verde eluyen especies cuyas masas moleculares son superiores a 100 kDa, en la zona roja especies moleculares entre 100 y 1 kDa aproximadamente, y en la zona azul especies con masa molecular menor a 1 kDa.

El perfil de elución de las globulinas muestra que en la zona de altos pesos moleculares, superior a 100 kDa se encuentra presente el pico más significativo del cromatograma. El perfil es similar al previamente descrito para el aislado (Resultados I) donde las globulinas 11S y 7S, de masas moleculares de 300 y 180 kDa respectivamente (Martínez y col. 1997 y Quiroga y col. 2010), eluyen en dicho pico. La **Tabla RIII.6** presenta las masas moleculares de los máximos de los picos, los respectivos volúmenes de elución y las áreas porcentuales que corresponden a cada uno de ellos y a las diferentes zonas del cromatograma. Para identificarlos claramente, los picos se encuentran indicados con los mismos números en la Tabla y en la Figura en la que se observan los cromatogramas.

Las globulinas hidrolizadas muestran un corrimiento muy marcado del perfil hacia volúmenes de elución más altos, presentando una gran cantidad de especies con pesos moleculares inferiores a los 100 kDa (**Tabla RIII.6**).

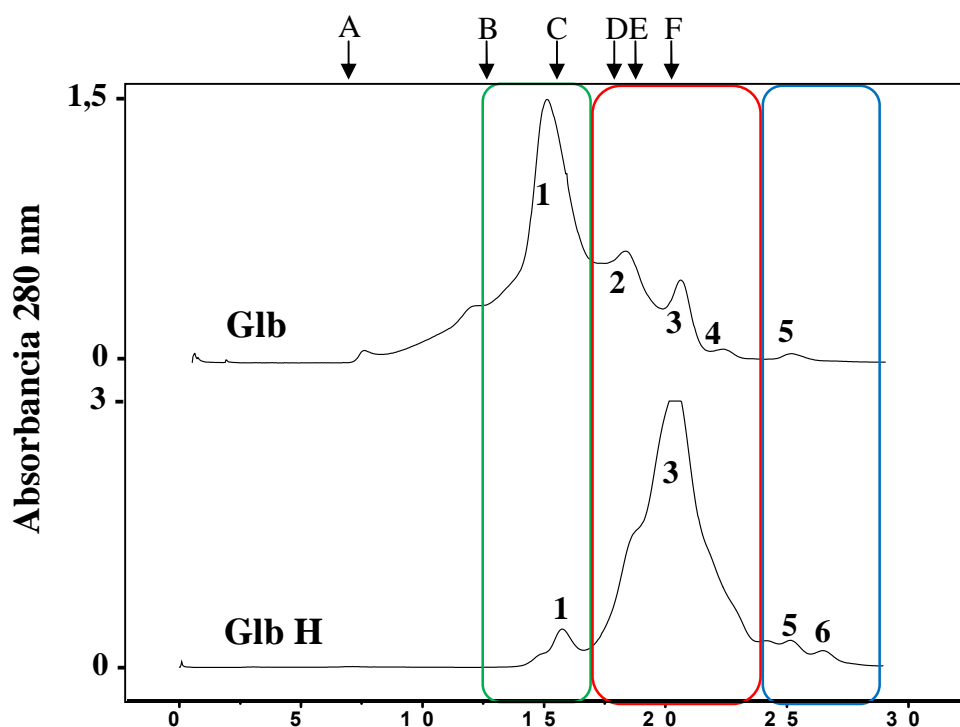


Figura RIII.4 Cromatogramas de la fracción globulina (**Glb**) y su hidrolizado (**Glb H**) eluidos con buffer K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM y NaCl 0,4 M, pH 7,8. Columna Superosa 6. Los recuadros de color indican tres zonas de interés (volúmenes de elución entre 12,5-16,5 ml, **verde**; entre 16,5-23,5 ml, **rojo**; y entre 23,5-27,5 ml, **azul**). La columna se calibró con azul dextrano (**A**), tiroglobulina (**B**), alcohol deshidrogenasa (**C**), albúmina (**D**), ovoalbúmina (**E**), y ribonucleasa (**F**).

Tabla RIII.6 Masa molecular (kDa) de las especies separadas en los cromatogramas de exclusión molecular de **Glb** y **Glb H**, sus respectivos volúmenes de elución, sus áreas porcentuales y las áreas de cada zona.

	ZONA	verde	roja			azul	
	Pico número	1	2	3	4	5	6
	Vol elución (ml)	14,8	18,1	20,4	22,2	25,1	26,5
	Masa molecular máximo del pico (kDa)	172,8	25,3	6,7	2,3	0,4	0,2
Glb	% Área zona	61,8	34,8			3,4	
	% Área pico*	61,8	20,9	10,4	3,5	3,4	-
Glb H	% Área zona	5,1	87,8			7,1	
	% Área pico*	5,1	-	87,8	-	3,9	3,2

* área pico/área total x 100

Como ya hemos mencionado, la globulina P de amaranto es una especie proteica caracterizada por su alto grado de polimerización. Pertenece a la familia de las globulinas 11S, y la molécula completa tiene una masa molecular entre 300 y 360 kDa. La fracción presenta especies de alto peso molecular y sólo un tercio de sus moléculas no se encuentran agregadas (Martínez y col., 1997; Castellani, 2000). El perfil de elución para esta fracción (**Figura RIII.5**) se condice con lo anteriormente mencionado. Gran parte de la fracción eluye en el volumen muerto (volumen de elución de 7 ml), correspondiéndose ese pico a los agregados de elevada masa molecular, superior a los 500 kDa (Aphalo y col., 2004). El cromatograma exhibe además, dos importantes picos con PM de 260 y 7,5 kDa aproximadamente (**Tabla RIII.7**) presentes en las zonas verde y roja respectivamente.

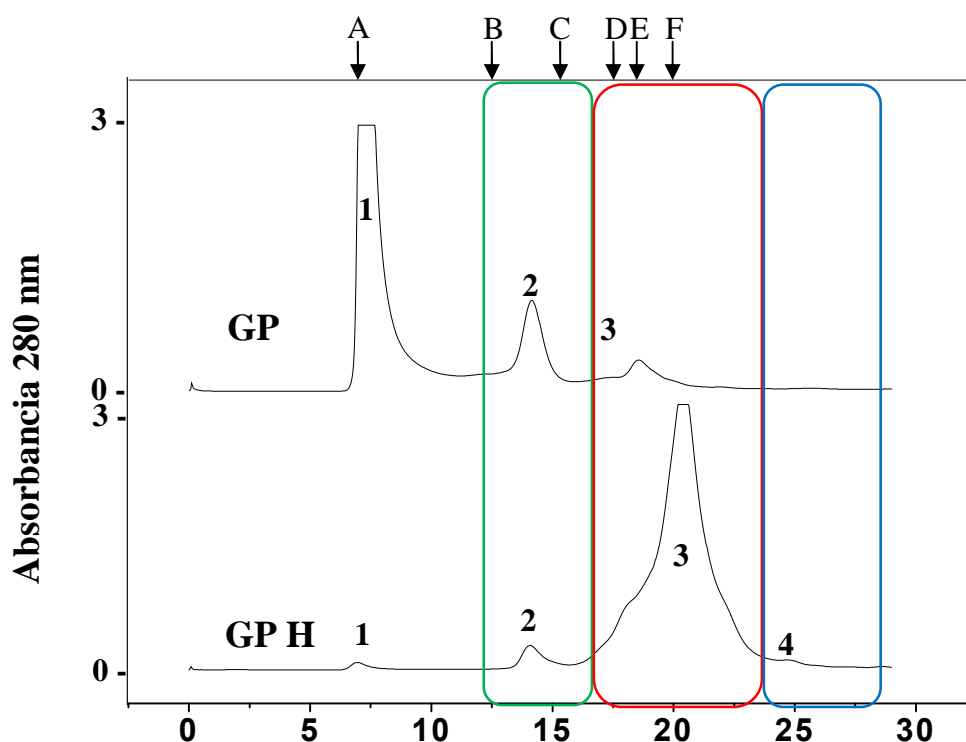


Figura RIII.5 Cromatogramas de la fracción globulina P (GP) y su hidrolizado (GP H) eluidos con buffer K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM y NaCl 0,4 M, pH 7,8. Columna Superosa 6. Los recuadros de color indican tres zonas de interés (volúmenes de elución entre 12,5-16,5 ml, **verde**; entre 16,5-23,5 ml, **rojo**; y entre 23,5-27,5 ml, **azul**). La columna se calibró con azul dextrano (A), tiroglobulina (B), alcohol deshidrogenasa (C), albúmina (D), ovoalbúmina (E), y ribonucleasa (F).

La **Tabla RIII.7** presenta las masas moleculares de los máximos de los picos de las especies separadas mediante la cromatografía realizada, los respectivos volúmenes de

elución del máximo de absorbancia y las áreas porcentuales que corresponden a cada uno de ellos y a las diferentes zonas del cromatograma. Los números indicados en la Figura se corresponden a los que se presentan en la Tabla. El perfil de la globulina P hidrolizada muestra significativas diferencias respecto al de la muestra sin tratamiento enzimático. Se observa la desaparición del pico donde se encontraban los agregados de alta masa molecular (zona del Vm), aumentando el área del pico conformado por especies con menor masa molecular, cercana a los 7 kDa (zona roja), demostrándose la efectividad de la proteólisis en la muestra estudiada.

Tabla RIII.7 Masa molecular (kDa) de las especies separadas en los cromatogramas de exclusión molecular de GP y GP H, sus respectivos volúmenes de elución, sus áreas porcentuales y las áreas de cada zona.

	ZONA	Vm	verde	rojo	azul
	Pico número	1	2	3	4
	Vol elución (ml)	7	14,1	20,2	24,7
	Masa molecular máximo del pico (kDa)	-	260,0	7,5	0,5
GP	% Área zona	61,5	23,8	14,7	0
	% Área pico *	61,5	23,8	14,7	-
GP H	% Área zona	1	4,8	91,8	2,4
	% Área pico *	1	4,8	91,8	2,4

* área pico/área total x 100

El cromatograma obtenido con la fracción glutelinas (**Figura RIII.6**) presenta picos de elución correspondientes a especies de masas moleculares entre 200 y 1 kDa, lo cual coincide con lo descrito por Gorinstein y col. (1991), Barba de la Rosa y col. (1992b) y Abugoch (2006). También se encuentra presente un pequeño pico en la zona del volumen muerto del cromatograma correspondiente a agregados de alta masa molecular.

Tal como hemos indicado para las otras fracciones, la **Tabla RIII.8** presenta los datos obtenidos a partir de los cromatogramas de la Glt y la Glt H. También para esta fracción el perfil de elución de las proteínas hidrolizadas muestra el desplazamiento de los máximos de los picos hacia volúmenes superiores, observándose un aumento del

área de la zona roja y una disminución del área de la zona verde (Tabla RIII.8). Los cambios en los cromatogramas se deben a la efectiva hidrólisis enzimática que se traduce en la aparición de especies de masa molecular menor que las originales.

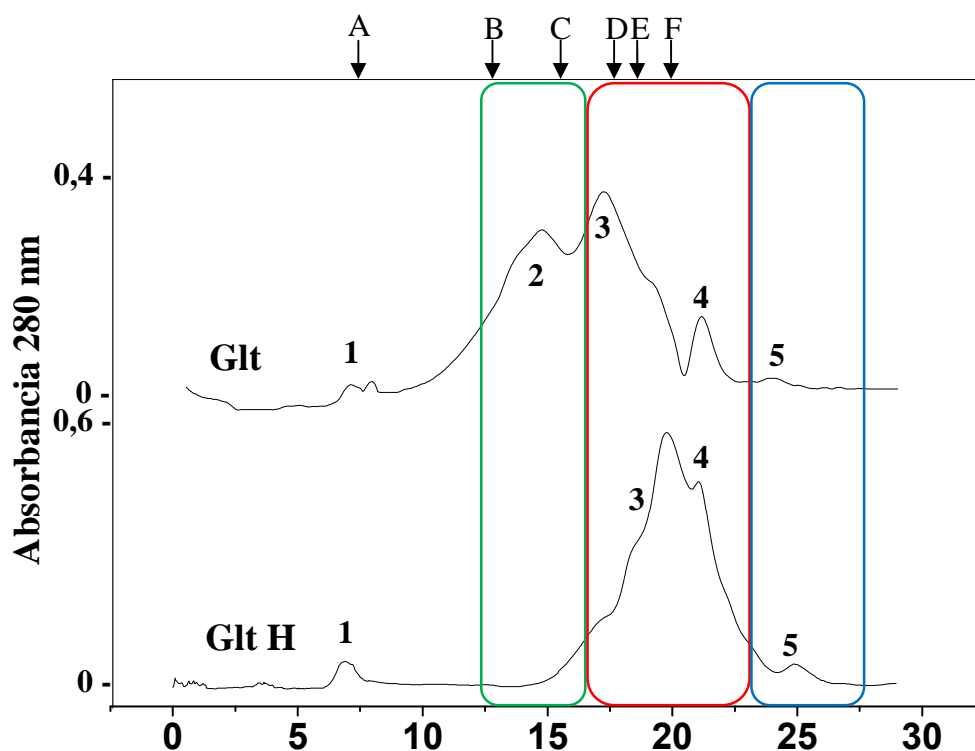


Figura RIII.6 Cromatogramas de la fracción glutelinas (Glt) y su hidrolizado (Glt H) eluidos con buffer K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM y NaCl 0,4 M, pH 7,8. Columna Superosa 6. Los recuadros de color indican tres zonas de interés (volúmenes de elución entre 12,5-16,5 ml, **verde**; entre 16,5-23,5 ml, **rojo**; y entre 23,5-27,5 ml, **azul**). La columna se calibró con azul dextrano (A), tiroglobulina (B), alcohol deshidrogenasa (C), albúmina (D), ovoalbúmina (E), y ribonucleasa (F).

Tabla RIII.8 Masa molecular (kDa) de las especies separadas en los cromatogramas de exclusión molecular de Glt y Glt H, sus respectivos volúmenes de elución, sus áreas porcentuales y las áreas de cada zona.

	ZONA	Vm	verde		rojo		azul
	Pico número	1	2	3	4		5
	Vol elución (ml)	7	14,7	17,2	21,1		24,0
	Masa molecular máximo del pico (kDa)	-	183,1	42,8	4,4		0,8
Glt	% Área zona	6,7	39,2	49,3			4,8
	% Área pico*	6,7	39,2	41,2	8,1		4,8
Glt H	% Área zona	4,8	-	89,5			5,7
	% Área pico*	4,8	-	62,4	27,1		5,7

* área pico/área total x 100

6.2 Determinación de la actividad antitrombótica

6.2.1 Método de las microplacas (MM)

La potencial actividad antitrombótica de las proteínas y péptidos de amaranto se evaluó mediante el ensayo de las microplacas (Materiales y métodos 3.3.1.1). Como ya hemos mencionado a lo largo de este trabajo, este método estudia efectos inhibitorios por parte de las muestras sobre la vía común de la coagulación.

Se estudiaron las fracciones proteicas de amaranto y los hidrolizados obtenidos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura RIII.7**. Como se observa nuevamente, hay dependencia de la inhibición de la coagulación con la concentración de proteínas.

Los datos obtenidos se procesaron con el programa GraphPad Prism 5, mediante el cual ajustamos los datos experimentales de las curvas dosis dependientes y calculamos las IC_{50} , concentraciones de proteínas que inhiben la formación del trombo en un 50%. Los valores obtenidos con las fracciones proteicas con y sin hidrólisis se presentan en la **Tabla RIII.9**.

La hidrólisis parece aumentar la potencial actividad antitrombótica de las fracciones Alb y Glb (**Figura RIII.7** y **Tabla RIII.9**), del mismo modo que encontramos para el aislado proteico de amaranto (Resultados I), donde se describió este hallazgo al hidrolizarlo mediante diferentes protocolos de hidrólisis. Todos ellos fueron efectivos a la hora de liberar péptidos bioactivos capaces de inhibir la coagulación. En cambio la fracción Glt resultó más efectiva que la Glt H. No pudo determinarse la potencial actividad antitrombótica de la fracción GP, debido a que la muestra se insolubiliza en el buffer del ensayo, generando una turbidez que es incompatible con la lectura espectrofotométrica en la que se basa el método.

Los resultados indican que, de todas las muestras analizadas, la fracción Glt y su hidrolizado presentan la mayor actividad antitrombótica, ya que concentraciones del orden de los $\mu\text{g/ml}$ inhiben el 50% de la coagulación. Estos valores son significativamente inferiores a los informados en bibliografía por Zhang y col. (2008) y por Yang y col. (2006). Como ya hemos mencionado, estos autores encontraron valores de IC_{50} entre 30 mg/ml y 50 mg/ml para péptidos de semillas de colza y clara de huevo

empleando la misma metodología. La fracción glutelinas también resultó significativamente más activa que los aislados proteicos de amaranto hidrolizados con los diferentes protocolos de hidrólisis (Resultados I) donde el hidrolizado más activo, Hdr_{DGS}, presentó un IC₅₀ de $0,23 \pm 0,02$ mg/ml.

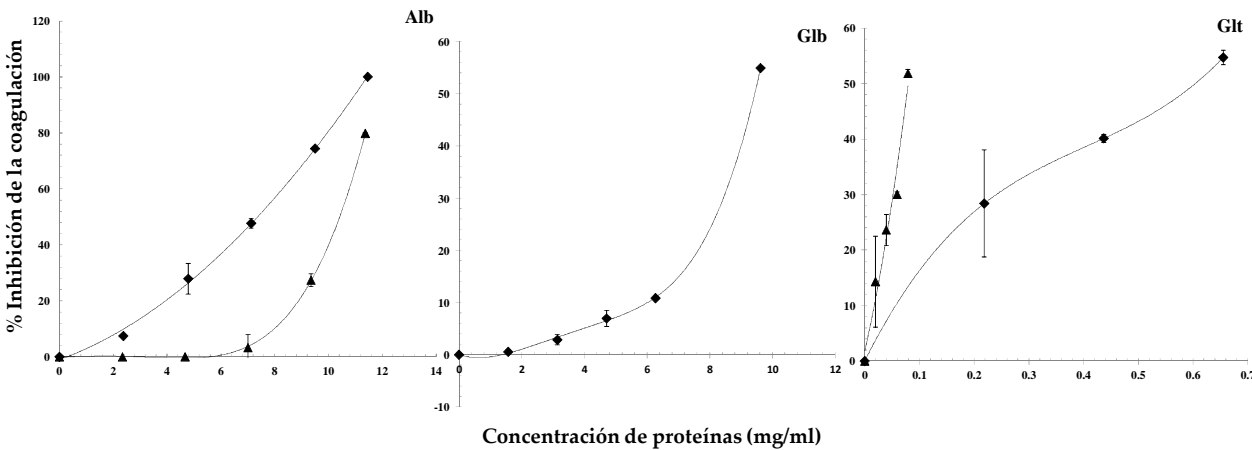


Figura RIII.7 Curvas de inhibición de la coagulación de las fracciones proteicas (triángulos) y sus hidrolizados (rombos). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Tabla RIII.9 Concentraciones de proteína de las fracciones proteicas de amaranto que provocan la inhibición de la coagulación en un 50% (IC₅₀).

	<i>Albúminas</i>	<i>Globulinas</i>	<i>Globulina P</i>	<i>Glutelinas</i>
<i>IC₅₀ (mg/ml) muestras</i>	$10,160 \pm 0,001^d$	nd	-	$0,080 \pm 0,003^a$
<i>IC₅₀ (mg/ml) muestras H</i>	$7,36 \pm 0,12^c$	$9,379 \pm 0,001^d$	-	$0,74 \pm 0,07^b$

nd: IC₅₀ no determinado a las concentraciones utilizadas
Diferentes letras en superíndice corresponden a diferentes valores ($\alpha = 0,05$, LSD)

Debido a que tanto la fracción Glt como la Glt H mostraron actividad antitrombótica muy superior a la que presentaron las otras fracciones y los aislados hidrolizados, y que como hemos mencionado en la caracterización de esta fracción, presenta mayor contenido de sales ($17,9 \pm 0,8\%$ de cenizas, **Tabla RIII.2**), se decidió estudiar la incidencia de la concentración salina en el ensayo de coagulación. El propósito seguido fue descartar artefactos que pudieran llevarnos a atribuir erróneamente la inhibición de la coagulación a las proteínas. Con ese objetivo se diseñó un ensayo para estudiar el efecto de la concentración de sal en la formación y características del coágulo. En dicho experimento se varió la fuerza iónica del buffer del

ensayo adicionando NaCl para lograr una concentración final entre 0 y 20 mg/ml. El ensayo se realizó entonces sin adicionar ningún agente que inhiba la coagulación y se midió la turbidez. A concentraciones de NaCl superiores a 10 mg/ml no se detectó turbidez. Aunque se formó coágulo para cualquier concentración de NaCl agregada, cuando la concentración salina superó 10 mg/ml, el coágulo formado fue completamente transparente, lo que será registrado como inhibición total de la coagulación, generando falsos resultados positivos. Sin embargo, los valores de fuerza iónica que provocaron tal efecto son superiores a aquellos que se corresponden con el contenido de sales final presente en el ensayo luego de adicionada la fracción glutelinas (< 1 mg/ml). Este ensayo control nos permitió confirmar que la inhibición de la coagulación detectada se debe a la presencia de las proteínas de la muestra que manifiestan actividad antitrombótica *in vitro*.

6.2.2 Pruebas globales de la hemostasia

Las pruebas globales de la hemostasia, de uso común en la bioquímica clínica, permiten evaluar irregularidades en distintos puntos de las vías de la coagulación. Fueron utilizadas en este capítulo como pruebas de *screening* que estudian la potencial actividad antitrombótica de las fracciones proteicas de amaranto y los péptidos liberados por parte de las mismas una vez que se las somete a una hidrólisis enzimática. Estas pruebas representan más cercanamente la real complejidad que tiene el proceso de la coagulación que el ensayo de las microplacas, ya que se utiliza plasma humano citratado como fuente de los diversos factores de la coagulación. Si los tiempos necesarios para detectar el coágulo en presencia de las muestras a estudiar son mayores a los obtenidos con el plasma control, indicará potencial actividad antitrombótica. La evaluación de los tiempos de protrombina, de trombina y de tromboplastina parcial activada se realizaron utilizando kits comerciales marca Wiener lab, como se mencionó en Materiales y métodos (3.3.1.2). Los resultados se muestran en la **Tabla RIII.10**.

El tiempo de protrombina (PT) permite evaluar la vía extrínseca de la coagulación, la cual es una de las vías de iniciación de la cascada de la coagulación. Recibió este

nombre debido a que fue posible notar desde un primer momento que la iniciación de esta vía requería de factores ajenos a la sangre. La vía extrínseca es muy rápida, se cumple en apenas unos segundos, mientras que la intrínseca insume varios minutos.

Tabla RIII.10 Tiempos de Protrombina (PT), Tiempos de Trombina (TT) y Tiempos de Tromboplastina Parcial Activada (APTT).

	<i>PT (s)</i>	<i>Concentración de proteínas (mg/ml)</i>	<i>TT (s)</i>	<i>Concentración de proteínas (mg/ml)</i>	<i>APTT</i>	<i>Concentración de proteínas (mg/ml)</i>
<i>Control</i>	$14,0 \pm 0,0^a$	0,00	$19,5 \pm 0,7^{ab}$	0,00	$37,0 \pm 1,4^a$	0,00
<i>Albúminas</i>	$18,0 \pm 0,0^c$	$3,7 \pm 0,10$	$25,0 \pm 0,0^{bcd}$	$5,6 \pm 0,20$	$82,8 \pm 2,8^f$	$3,7 \pm 0,10$
<i>Albúminas H</i>	$17,5 \pm 0,5^c$	$3,76 \pm 0,01$	$33,0 \pm 0,0^{de}$	$5,64 \pm 0,05$	$53,0 \pm 1,4^d$	$3,76 \pm 0,01$
<i>Globulinas</i>	$14,5 \pm 0,7^a$	$0,54 \pm 0,02$	$20,0 \pm 0,0^{ab}$	$0,81 \pm 0,03$	$41,4 \pm 1,4^b$	$0,54 \pm 0,02$
<i>Globulinas H</i>	$17,0 \pm 0,0^{bc}$	$2,48 \pm 0,03$	$28,0 \pm 0,0^{cde}$	$3,73 \pm 0,05$	$39,5 \pm 0,7^{ab}$	$2,48 \pm 0,03$
<i>Globulina P</i>	$15,0 \pm 0,0^a$	$2,30 \pm 0,04$	$18,5 \pm 0,7^a$	$3,45 \pm 0,6$	$52,0 \pm 2,8^{cd}$	$2,30 \pm 0,04$
<i>Globulina PH</i>	$15,5 \pm 0,7^{ab}$	$2,22 \pm 0,03$	$23,5 \pm 0,7^{abcd}$	$3,33 \pm 0,04$	$42,5 \pm 0,7^b$	$2,22 \pm 0,03$
<i>Glutelinas</i>	$21,5 \pm 2,1^d$	$0,03 \pm 0,01$	$81,0 \pm 8,5^g$	$0,05 \pm 0,01$	$49,0 \pm 1,4^c$	$0,03 \pm 0,01$
<i>Glutelinas H</i>	$15,5 \pm 0,7^{ab}$	$0,35 \pm 0,02$	$29,5 \pm 0,7^d$	$0,52 \pm 0,03$	$39,5 \pm 0,7^{ab}$	$0,35 \pm 0,02$

Diferentes letras en superíndice en la misma columna corresponde a valores que presentan diferencias significativas ($\alpha = 0,05$, LSD).

Las muestras estudiadas, a las concentraciones especificadas en la **Tabla RIII.10**, prácticamente no indujeron cambios en los tiempos de coagulación respecto al obtenido con el plasma control. Sin embargo, la fracción glutelinas logró retrasar la aparición del coágulo por más de 6 segundos a muy baja concentración en plasma.

El tiempo de trombina (TT) evalúa la conversión de fibrinógeno en fibrina debido a la acción de la trombina, por lo que la presencia de sustancias que interfieran en la acción de la trombina sobre el fibrinógeno o las que bloquean la polimerización de los monómeros de fibrina conducen a un prolongamiento del mismo. Este ensayo se enfoca en la misma vía de la coagulación que el ensayo de las microplacas. Los resultados obtenidos indican que las muestras hidrolizadas produjeron un retardo en el tiempo de trombina, aumentándolo en diferente medida. Excepto la fracción Glt, que resultó más activa que la misma fracción hidrolizada, la hidrólisis resultó ser una herramienta valiosa para mejorar la actividad de las proteínas de amaranto. Así, la fracción Glt fue la

que produjo el máximo retardo de la formación del coágulo (60 segundos) a la menor concentración en plasma (50 $\mu\text{g/ml}$), seguida por la misma fracción hidrolizada, la cual generó un retraso de 10 segundos a una concentración cercana a los 500 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados hallados en el ensayo del tiempo de trombina correlacionan perfectamente con los ya presentados y obtenidos con el método de las microplacas. En ambas pruebas la fracción glutelinas resultó ser la más activa. Este resultado es interesante y esperable, ya que ambos ensayos estudian la vía común del proceso de coagulación. Cabe destacar que las concentraciones a las que las muestras exhiben bioactividad son similares.

El tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) es una prueba sensible a la deficiencia de factores procoagulantes del plasma así como a la presencia de ciertos inhibidores de la coagulación. Detecta anormalidades en la vía intrínseca, que es la que sirve de amplificación en la cascada de la coagulación. A diferencia de las pruebas TT y TP, los resultados obtenidos en el ensayo APTT indican que la fracción Glt no mostró efecto sobre la vía intrínseca de la coagulación, al menos a las concentraciones analizadas, mientras que las Alb fueron capaces de retrasar la formación del trombo por más de 40 segundos a una concentración en plasma menor a los 4 mg/ml . La fracción Alb no mostró actividad antitrombótica ni en el ensayo de microplacas ni con las pruebas globales en las que se determinaron el TT y el TP. Sin embargo, esto no es contradictorio con los resultados obtenidos en los otros ensayos, ya que en el APTT se estudian aspectos de la coagulación diferentes de los que se analizan en el resto de las pruebas globales de la hemostasia. De este modo, diferentes fracciones proteicas producen el máximo retraso en las diferentes pruebas de *screening* ensayadas. En el ensayo de APTT se encontró que las fracciones proteicas sin hidrolizar produjeron mayor retardo en la formación del coágulo que las mismas proteínas hidrolizadas, mientras que en los otros ensayos, a excepción de las Glt, los hidrolizados presentaron mayor actividad antitrombótica que las correspondientes muestras sin hidrolizar.

Las muestras que generaron retrasos significativos en la formación del coágulo en TT y APTT se estudiaron a concentraciones inferiores que las que presentamos en la

Tabla RIII.10. Los tiempos de coagulación resultaron significativamente iguales a los respectivos controles, dando indicios de un posible comportamiento del tipo dosis-respuesta en todas ellas, aunque no fue posible confirmarlo.

Los resultados obtenidos para el ensayo de TT son comparables con aquellos descritos por Jung y Kim (2009), quienes determinaron la actividad anticoagulante de un extracto de bivalvo marino, *Mytilus edulis*. Ellos encontraron retrasos en la formación del coágulo de $11,6 \pm 0,4$ a $42,1 \pm 0,9$ segundos para el tiempo de trombina, usando una concentración de 3,8 mg/ml de extractos de proteína soluble de *M. edulis* (MEAP), y de $81,3 \pm 0,8$ segundos con un tetrapéptido anticoagulante purificado a partir del mismo bivalvo. Jung y col. (2007) también describieron una proteína purificada inhibidora proveniente de la concha de la almeja que prolonga el tiempo normal de coagulación hasta $112,8 \pm 1,2$ segundos al estudiar el TT. La Glt mostró una bioactividad similar a las descritas para el tetrapéptido MEAP y la proteína inhibidora de la concha de la almeja sin ningún paso de purificación previo, indicando la presencia de péptidos potencialmente anticoagulantes, con alta actividad en esta fracción de las proteínas de la semilla de amaranto. Es importante mencionar que, aunque los péptidos exhiben actividad inhibitoria, ésta no es comparable con aquella mostrada por la heparina, ya que el anticoagulante comercial fue capaz de prolongar por más de 300 segundos el tiempo de aparición de coágulo en las pruebas de APTT, PT y TT (Jung y col., 2001) a una concentración de 2,8 µg/ml.

La alta bioactividad hallada para la fracción glutelinas nos obliga a preguntarnos por qué no logramos detectar actividad antitrombótica en los aislados proteicos de amaranto de los que esta fracción forma parte (Resultados I). Una posible respuesta a esta interrogante es que la fracción glutelinas es minoritaria frente a otros componentes del aislado. Sin embargo no puede descartarse la posibilidad de que la bioactividad se asocie al tratamiento alcalino (pH 10) necesario para la extracción de la fracción, de modo que el aislado en las mismas condiciones podría presentar bioactividad.

6.3 Conclusiones del capítulo

✓ El tratamiento enzimático con proteasas comerciales sobre las fracciones proteicas de amaranto produce moléculas de baja e intermedia masa molecular, presentando importantes diferencias estructurales comparándolas con sus fracciones nativas.

✓ La proteólisis aumenta en la mayoría de las muestras estudiadas la potencial actividad antitrombótica, generando péptidos con mayor bioactividad.

✓ La fracción albúminas exhibió la mayor prolongación del tiempo de formación del coágulo en el ensayo de APTT, mientras que las glutelinas y glutelinas hidrolizadas presentaron la mayor actividad antitrombótica en los ensayos de las microplacas, y prolongaron más los tiempos de coagulación en las pruebas de TT y de TP.

Con los resultados alcanzados no resulta posible establecer el mecanismo de acción de la fracción albúminas en el ensayo de APTT, pero se puede inferir que el mecanismo de acción de las glutelinas o las glutelinas hidrolizadas involucra la vía común de la coagulación, inhibiendo la actividad de la trombina, bloqueando la polimerización de los monómeros de fibrina a causa de su unión con los péptidos bioactivos o impidiendo la acción de la enzima trombina a causa de la unión de los péptidos bioactivos a la región del fibrinógeno donde actúa la proteasa.

✓ Estos resultados nos inducen a pensar que polipéptidos o péptidos presentes en esta glutelina de amaranto serían los principales responsables de la bioactividad.



CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Con el fin de obtener conocimientos que sirvan de aporte para futuros desarrollos de alimentos funcionales que contengan a las proteínas de amaranto como uno de sus ingredientes, en este trabajo nos hemos propuesto estudiar los aspectos básicos de la actividad antitrombótica de las proteínas de amaranto.

Primeramente se estudiaron diversos protocolos de hidrólisis sobre los aislados proteicos de amaranto como una herramienta que nos permitiese generar distintos polipéptidos y péptidos activos. Se pudo observar que las hidrólisis probadas produjeron moléculas de baja e intermedia masa molecular con importantes diferencias estructurales respecto a sus proteínas nativas, alcanzándose el mayor grado de hidrólisis para el aislado sometido a la digestión gastrointestinal simulada. En todos los casos se observó que el tratamiento enzimático sobre las proteínas de amaranto generó péptidos con potencial actividad antitrombótica, siendo mucho más efectivo cuando la hidrólisis fue realizada por las enzimas gastrointestinales utilizadas en la simulación.

Los resultados prometedores obtenidos con el aislado sometido a la digestión gastrointestinal nos impulsaron a seleccionarlo para ahondar en la búsqueda de péptidos con actividad antitrombótica presentes en las proteínas de amaranto, realizándose determinaciones *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* sobre la muestra. En los ensayos realizados con animales se pudieron estudiar parámetros asociados a las distintas etapas de la hemostasia. Así, durante los estudios *ex vivo* se observó que los parámetros asociados a la formación del tapón plaquetario fueron significativamente diferentes para el grupo que consumió la dieta con amaranto respecto al grupo control, indicando un posible efecto del aislado proteico de amaranto sobre esta etapa de la hemostasia. El parámetro asociado a la etapa de la coagulación del grupo de animales que ingirió amaranto como parte de su dieta diaria también presentó diferencias significativas con el obtenido para el grupo control, mostrando probables efectos inhibitorios por parte de las proteínas de amaranto sobre la cascada de la coagulación.

Los resultados obtenidos al estudiar la inhibición de la coagulación *in vitro* coinciden con los resultados obtenidos al evaluar la actividad inhibitoria *ex vivo*, donde

CONCLUSIONES GENERALES

se encontraron aumentos significativos en los tiempos de formación del coágulo durante el estudio del tiempo de trombina determinado con plasma de los animales del grupo amaranto. Mientras que los valores en los ensayos *in vivo* de tiempo de sangría no presentaron diferencias significativas entre el grupo amaranto y el grupo control, aunque los resultados sugieren que el aislado proteico de amaranto presenta acción antitrombótica.

Los estudios realizados sobre los aislados digeridos con las enzimas gastrointestinales nos permiten concluir que los péptidos que se encuentran encriptados en las proteínas de amaranto, una vez liberados durante la digestión gastrointestinal serían capaces de ejercer un efecto antiplaquetario y/o anticoagulante, lo cual convierte a la muestra en estudio en un potencial agente antitrombótico.

Con el objeto de intentar comprobar la hipótesis anteriormente mencionada, se buscó purificar a aquellos péptidos responsables de la actividad antitrombótica y estudiar la potencial biodisponibilidad de los mismos. Se logró, de este modo, obtener una fracción con muy alta actividad antitrombótica *in vitro* mediante cromatografía de exclusión molecular por FPLC, cuya actividad resultó 3 veces mayor que la del hidrolizado original. Las pruebas de absorción realizadas utilizando esta fracción activa, junto con su secuenciación nos permitieron encontrar péptidos potencialmente bioactivos, algunos de los cuales lograron atravesar el epitelio intestinal representado por la monocapa celular desarrollada en el inserto. Nos encontramos actualmente a la espera de los péptidos sintéticos que nos permitirán comprobar la actividad de las secuencias seleccionadas en futuros ensayos en los que evaluaremos su actividad antitrombótica.

Paralelamente se analizaron las fracciones proteicas que constituyen el aislado proteico de amaranto para determinar si las especies bioactivas se encuentran particularmente en alguna de ellas. Los resultados mostraron que el tratamiento enzimático con proteasas comerciales sobre la mayoría de las muestras estudiadas generó péptidos con mayor bioactividad, aumentando de este modo la potencial

CONCLUSIONES GENERALES

actividad antitrombótica de las fracciones proteicas de amaranto, detectada empleando únicamente metodologías *in vitro*.

La fracción albúminas exhibió la mayor prolongación del tiempo de formación del coágulo en el ensayo que determina el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), mientras que las glutelinas y las glutelinas hidrolizadas presentaron la mayor actividad antitrombótica en los ensayos de las microplacas, y prolongaron más los tiempos de coagulación en las pruebas en las que se miden los tiempos de trombina y protrombina (TT y TP, respectivamente). Con los resultados alcanzados no fue posible establecer el mecanismo de acción de la fracción albúminas en el ensayo de APTT, pero se puede inferir que el mecanismo de acción de las glutelinas o las glutelinas hidrolizadas involucra la vía común de la coagulación, inhibiendo la actividad de la trombina, bloqueando la polimerización de los monómeros de fibrina a causa de su unión con los péptidos bioactivos o impidiendo la acción de la enzima trombina a causa de la unión de los péptidos bioactivos a la región del fibrinógeno donde actúa la proteasa.

Los resultados encontrados a lo largo de este trabajo de tesis fueron consistentes y nos inducen a pensar que en las proteínas de amaranto se encuentran encriptados péptidos bioactivos capaces de ejercer una actividad antitrombótica. Queda aún pendiente esclarecer el o los mecanismos de acción involucrados.

The image features a minimalist abstract design. Three green circles of varying sizes are arranged diagonally from the top right towards the bottom left. Each green circle is surrounded by a light gray ring, which is itself set within a larger, slightly offset light gray circle, creating a layered, 3D effect. Thin green lines extend from the top left and top right corners, converging towards the circles. The central text is in a bold, black, serif font.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abugoch, L.E. Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. **2006**.
- Abugoch L.E., Martínez N., Añón M.C. Influence of pH on structure and function of amaranth (*A. hypochondriacus*) protein isolates. *Cereal Chem.*; **2010**; 87: 448-453.
- Adibi S.A. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology*; **1997**; 113(1): 332-340.
- Adler-Nissen J. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*; **1979**; 12: 605-623.
- Akin-Idowu P.E, Odunola O.A., Gbadegesin M.A., Oke, A., Orkpeh U. Assessment of the protein quality of twenty nine grain amaranth (*Amaranthus* spp. L.) accessions using amino acid analysis and one-dimensional electrophoresis. *Afr. J. Biotechnol.*; **2013**; 12(15): 1802-1810.
- American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association. Functional foods. *J. Amer. Diet. Assoc.*; **1999**; 99: 1278-1285.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis, ed. 14. Ed Williams S., Arlington, VA. **1984**.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis. 15th edition. Washington, DC. **1990**.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis. 17th edition. Washington, DC. **2000**.
- Aphalo P., Castellani O.F., Martínez, N., Añón M.C. Surface physicochemical properties of Globulin-P amaranth protein. *J. Agric. Food Chem.*; **2004**; 52: 616-622.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arai S. Studies of functional foods in Japan. State of the art. Biosci. Biotech. Biochem.; **1996**; 60: 9-15.
- Artursson P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.; **1991**; 8: 305-330.
- Ashmarin I.P., Karazeeva E.P., Lyapina L.A., Samonina G.E. The simplest proline-containing peptides PG, GP, PGP and GPGG: regulatory activity and possible source of biosynthesis. Biochemistry-Moscow; **1998**; 63: 119-124.
- Atanassov A., Tchorbanov B. Synthetic and natural peptides as antithrombotic agents. A view on the current development. Biotechnol. Biotechnol.; **2009**; 23: 1109-1114.
- Bajusz S., Szell E., Bagdy D. Highly active and selective anticoagulants: D-Phe-Pro-Arg, a free tripeptide aldehyde prone to spontaneous inactivation, and its stable N-methyl derivative, D-MePhe-Pro-Arg-H. J. Med. Chem.; **1990**; 33: 1729-1735.
- Bale J.R., Kauffman C.S. Special Issue: Grain Amaranth: New potential for an old crop- editors overview. Food Rev. Int.; **1992**; 8(1): 1-4.
- Barba de la Rosa A.P., Gueguen J., Paredes-López O., Viroben G. Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. J. Agric. Food Chem.; **1992a**; 40: 931-936.
- Barba de la Rosa A.P., Paredes-López O., Gueguen J. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatografic techniques. J. Agric. Food Chem.; **1992b**; 40: 937-940.
- Barnes M.J., Knight C.G., Farndale R.W. The use of collagen-based model peptides to investigate platelet-reactive sequences in collagen. Biopolymers; **1996**; 40: 383-397.
- Barrio D.A., Añón M.C. Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. Eur. J. Nutr.; **2009**; 49: 73-82.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Becker R., Wheeler E., Lorenz K., Stafford A., Grosjean O., Betschart A., Saunders R. A compositional study of amaranth grain. *J. Food Sci.*; **1981**; 46: 1175-1180.
- Benítez R., Ibarz A., Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquím. clín. latinoam.*; **2008**; 42: 227-236.
- Bergmeier W., Piffath C.L., Goerge T., Cifuni S.M., Ruggeri Z.M., Ware J., Wagner D.D. The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **2006**; 103: 16900-16905.
- Beutler E., Lichtman M.A., Coller B.S., Kipps J.T. Williams Hematology. 5^{ta} ed. New York: McGraw Hill- Interamericana. **1990**.
- Bjork I., Lindahl U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Mol. Cell. Biochem.*; **1982**; 48(3): 161-182.
- Blum H., Beier H., Gross H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*; **1987**; 8: 93-99.
- Bouma B.N., Miles L.A., Beretta G., Griffin J.J. Human plasma prekallikrein. Studies of its activation by activated Factor XII and of its inactivation by diisopropyl phosphorfluoridate. *Biochemistry*; **1980**; 19:1151.
- Brass L.F. Thrombin and platelet activation. *Chest J.*; **2003**; 124(3): 18-25.
- Bressani R., García-Vela L.A. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.*; **1990**; 38: 1205-1209.
- Bressani R. Composition and nutritional properties of amaranth. *Amaranth. Biology, chemistry, and technology*. Ed. Paredes-López, O. Boca Raton, Florida: CRC Press; **1994**; pp. 185-206.
- Borghgrevink C.F. The mechanism of the prolonged bleeding time provoked by dextran

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- sulphate or by excessive doses of heparin. Acta Medica Scandinavica. Vol. 170, fasc. 3, **1961**.
- Butkowski R.J., Elion J., Downing M.R., Mann K.G. Primary structure of human prethrombin 2 and α -thrombin. J. Biol. Chem.; **1977**; 252: 4942-4957.
- Caessens P.W., Daamen W.F., Gruppen H., Visser S., Voragen A.G.J. β -Lactoglobulin hydrolysis. II. Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin. J. Agric. Food Chem.; **1999**; 47: 2980-2990.
- Caro I., Boluenc X., Rousset M., Meunier V., Bourrié M., Julian B., Joyeux H., Roques C., Berger Y., Zweibaum A., Fabre G. Characterization of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransforming of drugs. Int. J. Pharm.; **1995**; 116: 147-158.
- Caselato-Sousa V., Amaya-Farfán J. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. J. Food Sci.; **2012**; 77: 93-104.
- Castellani O.F., Martínez N.E., Añón M.C. Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl. J. Agric. Food Chem.; **1998**; 48: 4846-4853.
- Castellani O.F. Caracterización estructural y fisicoquímica de la Globulina-P de amaranto. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. **2000**.
- Castellani O.F., Martínez N.E., Añón M.C. Globulin-P structure modifications induced by enzymatic proteolysis. J. Agric. Food Chem.; **2000**; 48: 5624-5629.
- Cho H.R., Choi H.S. Effects of anticoagulant from *Spirodela polyrhiza* in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem.; **2003**; 67(4): 881-883.
- Chuang Y.J., Swanson R., Raja S.M., Olson S.T. Heparin enhances the specificity of antithrombin for thrombin and factor Xa independent of the reactive center loop

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- sequence. Evidence for an exosite determinant of factor Xa specificity in heparin-activated antithrombin. *J. Biol. Chem.*; **2001**; 276: 14961-14971.
- Cian R.E., Martínez-Augustin O., Drago S.R. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Res. Int.*; **2012**; 49: 364-372.
- Cochrane C.C., Griffin J.H. Molecular assembly in the contact phase of the Hageman factor system. *Review. Am. I. Med.*; **1979**; 67: 657.
- Condés M.C., Scilingo A., Añón M.C. Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *Food Sci. Technol.*; **2009**; 42: 963-970.
- Cossio-Bolaños M., Gómez Campos R., Vargas Vitoria R., Hochmuller Fogaça R.T., de Arruda M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutr Hosp.*; **2013**; 28(6): 2151-2156.
- Dabrowska A., Szołtysik M., Babij K., Pokora M., Zambrowicz A., Chrzanowska J. Application of Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*) serine proteinase for production of biologically active peptides from casein. *Acta biochim. Pol.*; **2013**; 60(1): 117-122.
- Davie E.W., Kulman J.D. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.*; **2006**; 1: 3-15.
- Day S.M., Reeve J.L., Myers D.D., Fay W.P. Murine thrombosis models. *Thromb. Haemost.*; **2004**; 92: 486-494.
- De Lumen, B. Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutr. Rev.*; **2005**; 63(1): 16-21.
- Dejana E., Villa S., De Gaetano G. Bleeding time in rats: a comparison of different experimental conditions. *Thromb. Haemost.*; **1982**; 48(1): 108-111.
- Di Virgilio A.L., Reigosa M., Arnal P.M., Fernández Lorenzo de Mele M. Comparative

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J. Hazard. Mater.*; **2010**; 177: 711-718.
- Dinnella C., Gargaro M.T., Rossano R., Monteleone E. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. *Food Chem.*; **2002**; 78: 363-368.
- Drzewiecki J. Similarities and differences between *Amaranthus* species and cultivars and estimation of outcrossing rate on the basis of electrophoretic separations of urea-soluble seed proteins. *Euphytica*; **2001**; 119: 279-287.
- Dubois C., Panicot-Dubois L., Merrill-Skoloff G., Furie B., Furie B.C. Glycoprotein VI dependent and independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood*; **2006**; 107: 3902-3906.
- Dufossé L., De La Broisse D., Guerard F. Fish protein hydrolysates as nitrogen sources for microbial growth and metabolite production. *Recent Res. Devel. Microbiology*; **1997**; 1: 365-381.
- Eckert E., Zambrowicz A., Pokora M., Dabrowska A., Szoltysik M., Chrzanowska J., Trziszka T. Application of microbial proteases to obtain egg yolk protein hydrolysates with antioxidant and antimicrobial activity. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*; 2013; 1(86): 105-118.
- Erdmann K., Cheung B.W.Y., Schröder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nut. Biochem.*; **2008**; 19: 643-654.
- Escudero N.L., Zirulnik F., Gomez N.N., Mucciarelli S.I., Gimenez M.S. Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid metabolism. *Exp. Biol. Med.*; **2005**; 231: 50-59.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Fiat A.M., Migliore-Samour D., Jollès P., Drouet L., Sollier C.B.D., Caen J. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.*; **1993**; 76: 301-310.
- Fisher R.A. Statistical Methods for Research Workers. Oliver and Boyd. **1954**.
- Fritz M., Vecchi B., Rinaldi G., Añón M.C. Amaranth seed protein hydrolysates have *in vivo* and *in vitro* antihypertensive activity. *Food Chem.*; **2011**; 126: 878-884.
- Fujikawa K., Coan M.H., Legaz M.E., Davie E.W. Mechanism of activation of bovine factor X (Stuart factor) by intrinsic and extrinsic pathways. *Biochemistry*; **1974**; 13(26): 5290-5299.
- Gan Z.R., Gould R.J., Jacobs J.W., Freidman P.A., Polokoff M.A. Echistatin, a potent platelet aggregation inhibitor from venom of viper, *Echis carinatus*. *J. Biol. Chem.*; **1988**; 263: 19827-19832.
- García-Manzano A., González.Llaven J., Lemini C., Rubio-Póo C. Standarization of blood clotting tests with reagents used for humans. *Proc. West, Pharmacol. Soc.*; **2001**; 44: 153-155.
- Gersh B.J., Sliwa K., Mayosi B.M., Yusuf S. Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. *Eur. Heart J.*; **2010**; 31: 642-648.
- Gibbs B.F., Zougman A., Masse R., Mulligan C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res. Int.*; **2004**; 37: 123-131.
- Gobbetti M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R. Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; **2002**; 42: 223-239.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gobbetti M., Minervini F., Rizzello C.G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.*; **2004**; 57: 173-188.
- Goodsell D. Thrombin. January, Molecule of the Month. RCSB, Protein Data Bank. **2002**.
- Gorinstein S., Moshe R., Greene L., Arruda P. Evaluation of four amaranthus species trough protein electrophoretic patterns and their amino acid compositon. *J. Agric. Food Chem.*; **1991**; 39: 851-854.
- Gorinstein S., Zemser M., Friedman M., Rodriguez W.A., Martins P.S., Vello N.A., Tosello G.A., Paredes-López O. Physicochemical characterization of the structural stability of some plant globulins. *Food Chem.*; **1996**; 56: 131-138.
- Gorinstein S., Zemser M., Fliess A., Shnitman I., Paredes-López O., Yamamoto K., Kobayashi S., Taniguchi H. Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranths and some other proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; **1998**; 62(10): 1845-1851.
- Görög P., Ahmed A. Haemostatometer: A new *in vitro* technique for assessing haemostatic activity blood. *Thromb. Res.*; **1984**; 34: 341-357.
- Görög P., Kovacs I.B. Modelling coronary thrombosis from nonanticoagulated human blood *in vitro*. *Hematol. Pathol.*; **1990**; 4(1): 43-52.
- Görög P., Kovacs I.B. Coagulation of flowing native blood: advantages over stagnant clotting tests. *Thromb. Res.*; **1991**; 64: 611-619.
- Greene T.K., Schiviz A., Hoellriegl W., Poncz M., Muchitsch E.M. Towards a standardization of the murine tail bleeding model. *J. Thromb. Haemost.*; **2010**; 8: 2820-2822.
- Grüner S., Prostredna M., Aktas B., Moers A., Schulte V., Krieg T., Offermanns S., Eckes B., Nieswandt B. Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation*; **2004**; 110: 2946-2951.
- Han J., Lim S. Structural changes in corn starches during alkaline dissolution by vortexing. *Carbohydr. Polym.*; **2004**; 55: 193-199.
- Handin R.I. Chapter 53: bleeding and thrombosis. Kasper D.L., Braunwald E., Fauci A.S. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (16th edición). New York, NY: McGraw-Hill. **2005**.
- Hartmann R., Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*; **2007**; 18: 163-169.
- Hemker H.C., Van Rijn J.L., Rosing J., Van Dieijen G., Bevers E.M., Zwaal R.F. Platelet membrane involvement in blood coagulation. *Blood Cells*; **1983**; 9(2): 303-317.
- Hirsh J., O'Donnell M., Weitz J.I. New anticoagulants. *Blood*; **2005**; 105: 453-463.
- Huang T.F., Wu Y.J, Ouyang C. Trigramin, a low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.*; **1987**; 262: 16157-16163.
- Huang L.F., Shi H.L., Gao B., Wu H., Yang L., Wu X.J., Wang Z.T. Decichine enhances hemostasis of activated platelets via AMPA receptors. *Thromb. Res.*; **2014**; 133: 848-854.
- Huerta-Ocampo J.A., Barba de la Rosa A.P. Amaranth: a pseudo-cereal with nutraceutical properties. *Curr. Nutr. Food Sci.*; **2011**; 7: 1-9.
- Huffaker R.C. Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol.*; **1990**; 116: 199-231.
- Huntington J.A. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J. Thromb. Haem.*; **2005**; 3: 1861-1872.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hyun K.W., Jeong S.C., Lee D.H., Park J.S., Lee J.S. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides*; **2006**; 27: 1173-1178.
- Ibáñez S.M. Determinación de la actividad biológica de hidrolizados proteicos de amaranto preparados por acción de una proteasa endógena. Tesis de grado. Universidad Nacional de La Plata. **2012**.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1987**; 84: 9265-9269.
- Jo H.Y., Jung W.K., Kim S.K. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm *Urechis unicinctus*. *Process Biochem.*; **2008**; 43: 179-184.
- Jung W.K., Je J.Y., Kim H.J., Kim S.K. A novel anticoagulant protein from *Scapharca broughtonii*. *J. Biochem. Molec. Biol.*; **2001**; 35: 199-205.
- Jung W.K., Jo H.Y., Qian Z.J., Jeong Y.J., Park S.G., Choi I.W., Kim S.K. A novel anticoagulant protein with high affinity to blood coagulation factor Va from *Tegillarca granosa*. *J. Biochem. Molec. Biol.*; **2007**; 40: 832-838.
- Jung W.K., Kim S.K. Isolation and characterization of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Food Chem.*; **2009**; 117: 687-692.
- Kalyani B., Manjula K., Kusuma D.L. Food consumption pattern and weight gain of albino rats fed with irradiated and non-irradiated diet. *Indian J. L. Sci.*; **2012**; 2(1): 73-75.
- Kanai Y., Hediger M.A. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch.*; **2004**; 447(5): 469-479.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Karshikov A., Bode W., Tulinsky A., Stone S.R. Electrostatic interactions in the association of proteins: an analysis of the thrombin-hirudin complex. *Protein Sci.*; **1992**; 1: 727-735.
- Kee N.L.A, Mnonopi N., Davids H., Naudé R.J., Frost C.L. Antithrombotic/anticoagulant and anticancer activities of selected medicinal plants from South Africa. *Afr. J. Biotechnol.*; **2008**; 7(3): 217-223.
- Kitazato K., Kitazato K.T., Sasaki E., Minamiguchi K., Nagase H. Prolonged bleeding time induced by anticoagulant glycosaminoglycans in dogs is associated with the inhibition of thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb. Res.*; **2003**; 112: 83-91.
- Konishi Y., Horikawa K., Oku Y., Azumaya J., Nakatani N. Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agric. Biol. Chem.*; **1991**; 55: 1745-1750.
- Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A., Rantamäki P., Tupasela T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Technol.*; **1998**; 9: 307-319.
- Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A. Milk protein-derived bioactive peptides. Novel opportunities for health promotion. *IDF Bull.*; **2001**; 363: 17-26.
- Korhonen H., Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.*; **2006**; 16: 945-960.
- Koshiyama I., Hamano M., Fukushima D. A heat denaturation study of the 11S globulin in soybean seeds. *Food Chem.*; **1981**; 6: 309-312.
- Kovacs I.B., Mayou S.C., Kirby J.D. Infusion of a stable prostacyclin analogue, iloprost, to patients with peripheral vascular disease: lack of antiplatelet effect but risk of thromboembolism. *Am. J. Med.*; **1991**; 90: 41-46.
- Krinke G.J. The laboratory rat. *Handbook of experimental animals*. Academic Press. **2000**.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*; **2002**; 113: 71-88.
- Krishnaswamy S., Church W.R, Nesheim M.E., Mann K.G. Activation of human prothrombin by human prothrombinase: influence of factor Va on the reaction mechanism. *J. Biol. Chem.*; **1987**; 262(7): 3291-3299.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*; **1970**; 227: 680-685.
- Langguth P., Bohner V., Heizmann J., Merkle H.P., Wolfram S., Amidon G.L., Yamashita S. The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. *J. Control. Release*; **1997**; 46: 39-57.
- Laudano A.P., Doolittle R.F. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **1978**; 75: 3085-3089.
- Laudano A.P., Doolittle R.F. Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. Structural requirements, number of binding sites, and species differences. *Biochemistry*; **1980**; 19:1013-1019.
- Lavelle S.M., MacLombair M. Bleeding times and the antithrombotic effects of high-dose aspirin, hirudin and heparins in the rat. *It. J. Med. Sc.*; **1998**; 167(4): 216-220.
- Lee K.A., Kim S.H. SSGE and DEE, new peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation. *Food Chem.*; **2005**; 90: 389-394.
- Lemini C., Jaimez R., Medina-Jiménez M., Ávila M.E. Gender differences in response to chronic treatment with 17 β -oestradiol and 17 β -aminoestrogen pentolame on hemostasis in rats. *Indian J. Pharmacol.*; **2012**; 44: 749-753.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lensing A.W., Prandoni P., Prins M.H., Buller H.R. Deep-vein thrombosis. *Lancet*; **1999**; 353: 479-485.
- Lim S.S., Vos T., Flaxman A.D., Danaei G., Shibuya K., Adair-Rohani H. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*; **2012**; 380: 2224-2260.
- Liu Y., Jennings N.L., Dart A.M., Du X.J. Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice. *World J. Exp. Med.*; **2012**; 2(2): 30-36.
- Loewus F.A. Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates. *Anal. Chem.*; **1951**; 24: 219.
- López Farré A., Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev. Esp. Cardiol. Supl.*; **2013**; 13(B): 2-7.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*; **1951**; 193: 265-275.
- Lozoya-Gloria E. Biotechnology for an ancient crop: amaranth. *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*, p. 1-7. Boca Raton FL. CRC Press. **1994**.
- Mackman N., Tilley R.E., Key N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Review*; **2007**; 27: 1687-1693.
- Mangin P., Yap C.L., Nonne C., Sturgeon S.A., Goncalves I., Yuan Y., Schoenwaelder S.M., Wright C.E., Lanza F., Jackson S.P. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcRgamma deficiency. *Blood*; **2006**; 107: 4346-4353.
- Mason R.P., Rhodes D.G., Herbette L.G. Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- with biological membranes. J. Med. Chem.; **1991**; 34(3): 869-877.
- Marcone M.F., Kakuda Y., Yada R.Y. Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. Food Chem.; **1998**; 63: 265-274.
- Marcone M.F., Kakuda Y. A comparative study of functional properties of amaranth and soybean globulins isolates. Nahrung; **1999**; 43: 368-373.
- Marcone M.F. First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (Seabeach Amaranth). J. Agric. Food Chem.; **2000**; 48: 378-382.
- Marcus A.J., Broekman M.J., Pinsky D.J. COX inhibitors and thromboregulation. N. Engl. J. Med.; **2002**; 347: 1025-1026.
- Marcus A.J., Broekman M.J., Drosopoulos J.H. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. Semin. Thromb. Hemost.; **2005**; 31: 234-246.
- Marder V.J., Francis C.W., Doolittle R.F. Fibrinogen structure and physiology. In: Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J., Salzman E.W. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia: JB Lippincott, pp 145-163. **1982**.
- Marlowe C.K., Sinha U., Gunn A.C., Scarborough R.M. Design, synthesis and structure-activity relationship of a series of arginine aldehyde factor Xa inhibitors. Part 1: structures based on the (D)-Arg-Gly-Arg tripeptide sequence. Bioorg. Med. Chem. Lett.; **2000**; 10: 13-16.
- Márquez M.C., Vázquez M.A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. Process Biochem.; **1999**; 35: 111-117.
- Martínez N.E., Añón M.C. Composition and structural characterization of amaranth proteins isolates. An electrophoretic and calorimetric study. J. Agric. Food Chem.;

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1996; 44: 2523-2530.

Martínez N.E., Castellani O.F., Añón M.C. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.*; **1997**; 45: 3832-3839.

Martínez N. Caracterización de proteínas de amaranto. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. **1997**.

Martínez-Maqueda D., Miralles B., Recio I., Hernández-Ledesma B. Antihypertensive peptides from food proteins: A review. *Food Funct.* **2012**; 3: 350-361.

Maruyama S., Nonaka I., Tanaka H. Inhibitory effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related synthetic peptides on fibrinogen/thrombin clotting. *Biochim. Biophys. Acta*; **1993**; 1164: 215-218.

Massberg S., Gawaz M., Gruner S., Schulte V., Konrad I., Zohlnhöfer D., Heinzmann U., Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall *in vivo*. *J. Exp. Med.*; **2003**; 197: 41-49.

Mathers C.D., Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*; **2006**; 3(11): 442.

Matsui T., Osajima Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J. Pept. Sci.*; **1999**; 5(7): 289-297.

Mehta A.Y., Jin Y., Desai U.R. An update on recent patents on thrombin inhibitors (2010-2013). *Expert Opin. Ther. Patents*; **2013**; 24(1): 1-21.

Meisel H. Bioactive peptides from milk proteins: A perspective for consumers and producers. *Aust. J. Dairy Technol.*; **2001**; 56: 83-91.

Mendonça S., Saldiva P.H., Cruz R.J., Arêas J.A.G. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chem.*; **2009**; 116: 738-742.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Minervini F., Algaron F., Rizzello C.G., Fox P.F., Monnet V., Gobbetti M. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. Appl. Environ. Microbiol.; **2003**; 69(9): 5297-5305.
- Minkiewicz P. Dziuba J., Iwaniak A., Dziuba M., Darewicz M.J. BIOPEP-PBIL Tool for the analysis of the structure of biologically active motifs derived from food proteins. AOAC . Int.; **2010**; 91(4): 965-980.
- Molina M.I., Circosta A., Añón M.C., Petruccelli S. Mature *Amaranthus hypochondriacus* seeds contain non-processed 11S precursors. Phytochemistry; **2008**; 69(1): 58-65.
- Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. J. Comput. Chem. in press. **2009**.
- Morris Quevedo H.J., Arceo A.A., Farnés O.C., Díaz Abdala R.T. Combinaciones enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chlorella vulgaris*. Rev. Cubana Aliment. Nutr.; **2001**; 15(2): 85-89.
- Morrissey J.H., Macik B.G., Neuenschwander P.F., Comp P.C.. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. Blood; **1993**; 81: 734-744.
- Mosher D.F., Johnson R.B. Specificity of fibronectin–fibrin cross-linking. Ann. NY Acad. Sci.; **1983**; 408: 583-594.
- Myles T., Le Bonniec B.F., Betz A., Stone S.R. Electrostatic steering and ionic tethering in the formation of thrombi-hirudin complexes: the role of the thrombin anion-binding exosite-1. Biochemistry; **2001**; 40: 4972-4979.
- Nellans H.N. Mechanisms of peptide and protein absorption: Paracellular intestinal transport: modulation of absorption. Adv. Drug Deliver. Rev.; **1994**; 7(3): 339-364.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nielsen P.M., Petersen D., Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food. Sci.*; **2001**; 66(5): 642-646.
- Nieswandt B., Schulte V., Bergmeier W., Mokhtari-Nejad R., Rackebrandt K., Cazenave J.P., Ohlmann P., Gachet C., Zirngibl H. Long-term antithrombotic protection by *in vivo* depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J. Exp. Med.*; **2001**; 193: 459-469.
- Neyra N.R., Ikizler T.A., May R.E., Himmelfarb J., Schulman G., Shyr Y., Hakim R.M. Change in access blood flow over time predicts vascular access thrombosis. *Kidney Int.*; **1998**; 54: 1714-1719.
- Nkonge Ch., Ballance M. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests. *J. Agric. Food Chem.*; **1982**; 30: 416-420.
- Obst U., Banner D.W., Weber L., Diederich F. Molecular recognition at the thrombin active site: structure-based design and synthesis of potent and selective thrombin inhibitors and the X-ray crystal structures of two thrombin-inhibitor complexes. *Chem. Biol.*; **1997**; 4: 287-295.
- Orsini Delgado M.C., Tironi V.A., Añón M.C. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT- Food Sci. Technol.*; **2011**; 44: 1752-1760.
- Osborne T. The vegetable proteins. 2da edición ed. Longans y Green, Nueva York. **1924**.
- Ostrem J.A., Al-Obeidi F., Safar P., Safarova A., Stringer S., Patek M., Cross M.T., Spoonamore J., LoCascio J.C., Kasireddy P., Thorpe D.S., Sepetov N., Lenl M., Widgoose P., Strop P. Discovery of a novel, potent, and specific family of factor Xa inhibitors via combinatorial chemistry. *Biochemistry*; **1998**; 37: 1053-1059.
- Palm M., Frankenberg L., Johansson M., Jalkestén E. Evaluation of coagulation tests in mouse plasma. *Comp. Haematol. Int.*; **1997**; 7: 243-246.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*; **1987**; 327: 524-526.
- Paredes-López O. Amaranth: Biology, Chemistry and Technology. Boca Raton FL. CRC Press. **1994**.
- Pérez Campo E. Bioquímica de la proteína C de la coagulación. *Rev. Iberoam. Tromb. Hemost.*; **1994**; 7: 131-135.
- Pérez Ruíz A.O., Castillo Herrera J.A., Santos Rodríguez P., Martínez Alvarado D., Argudín Martínez P.J. Inhibidores fisiológicos de la coagulación. *Rev. Cubana Invest. Biomed.*; **1997**; 16(2): 144-149.
- Picariello G., Ferranti P., Fierro O., Mamone G., Caira S., Di Luccia A., Monica S., Addeo F. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: biological and toxicological implications. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*; **2010**; 878: 295-308.
- Prezoto B.C., Maffei F.H.A., Mattar L., Chudzinski-Tavassi A.M., Curi P.R. Antithrombotic effect of *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract on experimental venous thrombosis. *Braz. J. med. Biol. Res.*; **2002**; 35: 703-712.
- Quick A.J. Bleeding time after aspirin ingestion. *Lancet*; **1968**; 1: 50.
- Quiroga A.V., Martínez E.N., Añón M.C. Amaranth globulin polypeptide heterogeneity. *Protein J.*; **2007**; 26(5): 327-333.
- Quiroga A.V., Martínez E.N., Rogniaux H., Geairon A., Añón M.C. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) vicilin subunit structure. *J. Agr. Food Chem.*; **2010**; 58: 12957-12963.
- Quiroga A.V., Aphalo P., Ventureira J.L., Martínez E.N., Añón M.C. Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of amaranth

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. J. Sci. Food Agric.; **2012**; 92: 397-403.
- Quiroga A.V., Barrio D.A., Añón M.C. Amaranth lectin presents potential antitumor properties. LWT- Food Sci. Technol.; **2015**; 60: 478-485.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. R.; **1998**; 62: 597-635.
- Rasmussen U.B., Vouret-Craviari V., Jallat S., Schlesingerl Y., Pages G., Paviranil A., Lecocq J.P., Pouyssegur J., Obberghen-Schilling E.V. cDNA cloning and expression of a hamster α -thrombin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization. FEBS Lett.; **1991**; 288: 123-128.
- Ratnoff O.D., Davie E.W. The activation of aChristmas factor (Factor IX) by activated plasma thromboplastin antecedent (activated Factor XI). Biochemistry; **1962**; 1(4): 677-685.
- Reeves P.G., Nielses F.H., Fahey G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J. Nutr.; **1993**; 123: 1939-1951.
- Rinaldi G., Bohr D.F. Potassium-induced relaxation of arteries in hypertension: modulation by extracellular calcium. Am. J. Physiol.; **1989**; 256(25): 707-712.
- Rinaldi G. Depósitos de calico sensible a la noradrenalina en la arteria de cola de ratas normotensas y espontáneamente hipertensas: efectos de la rianodina y cafeína. Acta Pysiol. Pharmacol. Latinoam.; **1990**; 40: 339-355.
- Rinderle S.J., Goldstein I.J., Matta K.L., Ratcliffe R.M. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. J. Biol. Chem.; **1989**; 264(27): 16123-16131.
- Roberfroid M.B. Concepts and strategy of Functional Foods Science: the European

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Perspective. Am. J. Clin. Nutr.; **2000**; 71: 1660-1664.
- Roesler K.R., Rao A.G. Rapid gastric fluid digestion and biochemical characterization of engineered proteins enriched in essential amino acids. J. Agric. Food Chem. **2001**, 4: 3443-3451.
- Rubinstein A.L., Colantonio L., Bardach A., Caporale J., García Martí S., Kopitowski K., Alcaraz A., Gibbons L., Augustovski F., Pichón-Rivière A. Estimate of the cardiovascular disease burden attributable to modifiable risk factors in Argentina. Rev. Panam. Salud Pública; **2010**; 27: 237-245.
- Rubinstein A.L., Irazola V.E., Poggio R., Bazzano L., Calandrelli M., Lanás Zanetti F.T., Manfredi J.A., Olivera H., Seron P., Ponzo J., He J. Detection and follow-up of cardiovascular disease and risk factors in the Southern Cone of Latin America: the CESCAS I study. BMJ Open; **2011**; 126: 1-6.
- Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C. Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. Nutrients; **2011**; 3: 765-791.
- Salnikow J., Zemser M., Gorinstein S., Friedman M., Scheler Ch., Paredes-López O. Structure-function relationships of folded and unfolded amaranth proteins. J. Prot. Chem.; **1998**; 17: 543-545.
- Sánchez C., Bartoli C., Vides M., Guglielmone H. Antigenic and functional levels of antithrombin III in full term newborns. Rev. Iberoam. Tromb. Hemost.; **1994**; 7: 73-75.
- Satake T., Kamiya K., An Y., Oishi Nee Taka T., Yamamoto J. The antithrombotic active constituents from *Centella asiatica*. Biol. Pharm. Bull.; **2007**; 30(5): 935-940.
- Schaller A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta; **2004**; 220: 183-197.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. Nat. Protoc.; **2006**; 1: 16-22.

Schechter I., Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. Biochem. Biophys. Res. Commun.; **1967**; 27: 157-162.

Scilingo A., Molina Ortiz S.E., Martínez N.E., Añón M.C. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. Food Res. Int.; **2002**; 35: 855-862.

Segura-Nieto M., Vázquez-Sánchez N., Rubio-Velázquez H., Olguín-Martínez L.E., Rodríguez-Néstor C.E., Herrera-Estrella L. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. J. Agric. Food Chem.; **1992**; 40: 1553-1558.

Segura-Nieto M., Barba de la Rosa A.P., Paredes-López O. Biochemistry of amaranth proteins. Amaranth: Biology, Chemistry and Technology, 75-106. Boca Raton FL. CRC Press. **1994**.

Silva-Sánchez C., Barba De La Rosa A.P., León-Galván M.F., De Lumen B.O., De León-Rodríguez A., González De Mejía E. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. J. Agric. Food Chem.; **2008**; 56: 1233-1240.

Shah, H. Effects of milk-derived bioactives: an overview. Br. J. Nutr.; **2000**; 84: 3-10.

Shahidi F. Functional Foods: their role in health promotion and disease prevention. J. Food Sci.; **2004**; 69: 146-149.

Shahidi F., Han X.Q., Synowiecki J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). Food Chem.; **1995**; 53: 285-293.

Shimizu M., Sawashita N., Morimatsu F., Ichikawa J., Taguchi Y., Ijiri Y., Yamamoto J. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. Thromb. Res.; **2009**; 123: 753-757.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Smith J.W., Ruggeri Z.M., Kunicki T.J., Cheresh D.A. Interaction of integrins and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. *J. Biol. Chem.*; **1990**; 265(21): 12267-12271.
- Stenberg P.E., Barrie R.J, Pestina T.I, Steward S.A., Arnold J.T., Murti A.K., Hutson N.K., Jackson C.W. Prolonged bleeding time with defective platelet filopodia formation in the wistar furth rat. *Blood*; **1998**; 91(5): 1599-1608.
- Stryer L., Cohen C., Langridge R. Axial period of fibrinogen and fibrin. *Nature*; **1963**; 197: 793-794.
- Taka T., Konishi Y., Slon-Usakiewicz J., Medvedkin V., Tsuda Y., Okada Y., Seki J., Yamamoto J. Inhibitory effect of various thrombin inhibitors on shear-induced platelet function and dynamic coagulation. *Eur. J. Pharmacol.*; **2000**; 406: 181-189.
- Tandang-Silvas M.R., Cabanos C.S., Carrazco Peña L.D., Barba De La Rosa A.P., Osuna-Castro J.A., Utsumi S., Mikami B., Maruyama N. Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglubulin, from *Amaranthus hypochondriacus*: Insight into its physico-chemical properties. *Food Chem.*; **2012**; 135: 819-826.
- Tang C.H., Wang X.Y. Physicochemical and structural characterization of globulin and albumin from common buckwheat (*Fagopyrum esculenum Moench*) seeds. *Food Chem.*; **2010**; 121: 119-126.
- Tiengo A., Faria M., Netto F.M. Characterization and ACE-inhibitory activity of amaranth proteins. *J. Food Sc.*; **2009**; 74: 121-126.
- Tironi V.A., Añón M.C. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Res. Intern.*; **2010**; 43: 315-322.
- Tukey J. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics.*; **1949**; 5(2): 99-114.
- Tuma P.L., Hubbard A.L. Transcytosis: Crossing cellular barriers. *Physiol Rev.*; **2003**; 83:

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

871-932.

Udenigwe C.C., Aluko R.E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J. Food Sci.*; **2012**; 77: 11-24.

Vecchi B., Añón M.C. ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochem.*; **2009**; 70: 864-870.

Ventureira J. Propiedades estructurales y funcionales de preparados proteicos de amaranto modificados y soja-amaranto. Tesis doctoral. **2010**.

Ventureira J., Martínez E.N., Añón M.C. Effect of acid treatment on structural and foaming properties of soy amaranth protein mixtures. *Food Hydrocoll.*; **2012**; 29: 272-279.

Vermeirssen V., Van Camp J., Verstraete W. Bioavailability of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides. *Brit. J. Nutr.*; **2004**; 92: 357-366.

Verrey F., Closs E.I., Wagner C.A., Palacin M., Endou H., Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch*; **2004**; 447(5): 532-542.

Vidal-Carou M.C. Alimentos funcionales: algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y a cómo declarar sus efectos sobre la salud. *Humanidades Médicas*; **2008**; 24: 1-27.

Vieira S.J., Pinho O., Ferreira I.M. Enzymatic hydrolysis by commercial proteases of brewers spent grain proteins. *IJUP* pp 369. **2011**.

Vioque J., Sánchez Vioque R., Clemente A., Pedroche Jiménez J.J., Yust M., Millán F. Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y aceites*; **2000**; 51: 361-365.

Vorotyntseva T.I., Bessmertnaia L.I., Zilberman M.I., Mikhaïlova A.G., Antonov V.K. Proteases from the enterocytes of the porcine small intestine. Role of aminopeptidase N in the transport of dipeptides. *Biokhimiia*; **1984**; 49(11): 1854-1861.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vu T.K.H., Hung D.T., Wheaton V.I., Caughlin S.R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*; **1991**; 64: 1057-1068.
- Walsh R., Martin E., Darvesh S. A method to describe enzyme-catalyzed reactions by combining steady state and time course enzyme kinetic parameters. *Biochim. Biophys. Acta*; **2010**; 1800: 1-5.
- Walz D.A., Hewett-Emmett D., Seegers W.H. Amino acid sequence of human prothrombin fragments 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1977**; 74(5): 1969-1972.
- World Health Organization, Geneva. **2008**. The global burden of disease: 2004 update.
- World Health Organization, Geneva. **2011a**. Global status report on noncommunicable diseases 2010.
- World Health Organization, Geneva. **2011b**. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.
- Yamada K., Naemura A., Sawashita N., Noguchi Y., Yamamoto J. An onion variety has natural antithrombotic effect as assessed by thrombosis/thrombolysis models in rodents. *Thromb. Res.*; **2004**; 114: 213-220.
- Yamamoto J., Taka T., Nakajima S., Ueda M., Sugimoto E., Sasaki Y., Muraki T., Seki T., Watanabe S. A shear-induced *in vitro* platelet function test can assess clinically relevant anti-thrombotic effects. *Platelets*; **1999**; 10: 178-184.
- Yamashita S., Tanaka Y., Endoh Y., Taki Y., Sakane T., Nadai T., Sezaki H. Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer: implication for predicting *in vivo* drug absorption. *Pharm. Research*; **1997**; 14: 486-491.
- Yamashita S., Furubayashi T., Kataoka M., Sakane T., Sezaki H., Tozuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Pharm. Sci.; **2000**; 10: 195-204.

Yamashita S., Konishi K., Yamasaki Y., Taki Y., Sakane T., Sezaki H., Furuyama Y. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system. J. Pharm. Sci.; **2002**; 91(3): 669-679.

Yang W.G., Wang Z., Xu S.Y. A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. Chin. Chem. Lett.; **2007**; 18: 449-451.

You W.K., Choi W.S, Koh Y.S, Shin H.C, Jang Y., Chung K.H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. FEBS Letters; **2004**; 571: 67-73.

Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S., Dans T., Avezum A., Lanas F., McQueen M., Budaj A., Pais P., Varigos J., Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet; **2004**; 364: 937-952.

Zhang S.B., Wang Z., Xu S.Y. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. J. Am. Oil Chem. Soc.; **2008**; 85: 521-527.